



**Universidade de Aveiro** Departamento de Biologia

**2005**

**Maria João  
Coelho Machado**

**Estrogénio e a via de transdução de sinal de TGF $\beta$   
na angiogénese**



**Maria João  
Coelho Machado**

**Estrogénio e a via de transdução de sinal de TGF $\beta$   
na angiogénese**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Microbiologia Molecular, realizada sob a orientação científica do Doutor Fernando Carlos de Landér Schmitt, Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.

## **dedicatória**

Aos meus pais. Obrigado pelas oportunidades que sempre me deram.

Muito obrigado aos meus avós, Glória e Joaquim, por terem acreditado em mim e por sempre se terem interessado pela minha opinião.

Pelo apoio, incentivo, força e pela incapacidade de se resignarem, gostava de dedicar este trabalho à Gi e à minha avó Beatriz, em particular.

Pela inspiração e pela motivação, por nunca me terem deixado abandonar os meus sonhos. Se hoje sou uma pessoa melhor é muito devido ao vosso exemplo: para o avô Rolando e para o avô Júlio.

Para a Carmo, para a Ana Luísa, para a Zé, para a Cláudia e para o Zé. Sem a vossa amizade, energia, apoio, carinho e muita paciência o caminho teria muitos mais espinhos.

## **o júri**

presidente

**Prof. Doutor António Carlos Matias Correia**  
Professor Associado da Universidade de Aveiro

vogais

**Prof. Doutor Fernando Carlos de Landér Schmitt**  
Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

**Prof. Doutor Rui Manuel Vieira Reis**  
Professor Auxiliar da Escola de Ciências da Saúde da Universidade do Minho

## **agradecimentos**

Ao Professor Fernando Schmitt, por ter aceito ser o meu orientador e por me ter permitido fazer aquilo que eu idealizei.

À Raquel Soares, por ter sido o início de todo o trabalho.

À Joana Paredes, pelo fenomenal apoio em horas difíceis.

À Raquel Seruca. Sem ela nada disto se teria concretizado. Muito obrigado por tudo, principalmente pela sua franqueza.

Ao André Albergaria, à Sílvia Carvalho, à Sara Ricardo, à Fernanda Milanezi e à Ana Sofia Ribeiro, o restante grupo da Mama, que comigo partilharam os momentos bons e os maus.

À Maria José Oliveira porque pessoas como ela já não se fazem. Muito obrigado pelos bons conselhos e pelo incentivo.

À Ana Sofia Rocha pela preocupação, compreensão, apoio e conselhos. Obrigado por não me deixares sentir só na minha luta.

À Raquel Lima, à Patrícia Pontes e à Susana Ribeiro por sempre terem disponibilizado o seu tempo para mim.

Ao grupo das Mucinas, por me terem disponibilizado o vosso espaço, o vosso conhecimento, o vosso apoio e a vossa solidariedade.

## palavras-chave

TGF $\beta$ , p-Smad, via de transdução de sinal, angiogénese

## resumo

O factor de crescimento transformante beta (TGF $\beta$ ) é essencial na regulação de processos fisiológicos, tais como: proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência, angiogénese e tolerância imunológica. Alterações nas vias de sinalização do TGF $\beta$  têm sido descritas em diferentes tipos de cancro.

Um dos mecanismos essenciais para o desenvolvimento de uma neoplasia é a formação de novos vasos sanguíneos. Para crescer além de 1 a 2mm<sup>3</sup> e superar as necessidades de nutrientes e oxigénio, o tumor necessita de induzir a formação de novos vasos através da angiogénese.

Apesar de o papel do TGF $\beta$  estar bem estabelecido na angiogénese, a via de transdução de sinal que este desencadeia nas células endoteliais parece ser diferente da sinalização clássica descrita em outras células.

Trabalho prévio do nosso grupo demonstrou que o TGF $\beta$  actua como mediador da angiogénese induzida por estrogénios. Ainda assim, os efeitos do estrogénio na sinalização por TGF $\beta$  não são conhecidos em detalhe.

No presente trabalho estudámos os efeitos desta hormona e de seu antagonista ICI 182,780 em células de carcinoma da mama (MCF-7) e células endoteliais (HUVEC). Nas células MCF-7 o 17 $\beta$ -estradiol aumenta a transcrição do TGF $\beta$  cerca de seis vezes em relação ao normal, enquanto que o anti-estrogénio puro ICI 182,780 bloqueia esta expressão. Nas células endoteliais HUVECs, demonstramos que o TGF $\beta$  induz cinéticas distintas de fosforilação das R-Smads.

Além disto, quando tratadas com meio condicionado proveniente de células MCF-7, previamente estimuladas com 17 $\beta$ -estradiol, estas células mostram alteração do equilíbrio das duas vias sinalizadoras do TGF $\beta$  com um predomínio da via ALK5 sobre a ALK1. O meio condicionado de células tratadas com ICI 182,780 actua de forma oposta em HUVECs.

Em conclusão, os nossos resultados demonstram que o estrogénio interfere com as vias de sinalização do TGF $\beta$ , com promoção de fosforilação das Smads 2 e 3 e inibição da fosforilação de Smad1. Esta observação é coadjuvada pela observação da regulação oposta exercida nestas duas vias pelo anti-estrogénio puro ICI 182,780, que pode ter um efeito inibitório na angiogénese e interferir na formação vascular.

## keywords

TGF $\beta$ , p-Smad, signal transduction pathway, angiogenesis

## abstract

Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) plays an essential role in the regulation of physiological processes, such as: proliferation, differentiation, migration, survival, angiogenesis and immunological tolerance. Alterations in the TGF $\beta$  transduction pathway have been described in several types of cancer.

One of the essential mechanisms to neoplastic progression is the formation of new blood vessels. In order to grow beyond 1 or 2mm<sup>3</sup> and overcome the need for nutrients and oxygen, the tumor needs to induce the angiogenic switch.

Although the role of TGF $\beta$  in angiogenesis has already been well established, the signalling events it triggers in endothelial cells seem to be somewhat different from the classical signal transduction pathway described for other cell types.

Previous work from our group has demonstrated that TGF $\beta$  is a mediator of estrogen-induced angiogenesis. Nevertheless, the influence of estrogens in TGF $\beta$  signalling is not extensively explored.

In the present work, we focused on the effects of this hormone and its antagonist ICI 182,780 on breast cancer cells (MCF-7) and endothelial cells (HUVEC). In MCF-7 cells, 17 $\beta$ -estradiol regulates the TGF $\beta$  transcript up to a six-fold increase, while ICI 182,780 blocks its expression. In HUVECs, we have demonstrated that TGF $\beta$  induces distinct R-Smad phosphorylation kinetics.

Furthermore, when treated with conditioned medium from 17 $\beta$ -estradiol-treated MCF-7 cells, the HUVECs exhibited an alteration in the balance between ALK5 and ALK1 signalling, with the first being predominant over the second. On the other hand, when treated with conditioned medium from ICI 182,780-treated MCF-7 cells, the HUVECs presented an opposite signalling induction profile.

Thus, our results demonstrate that estrogen interferes with TGF $\beta$  signalling, promoting Smad2 and Smad3 phosphorylation and down-regulating Smad1 phosphorylation. This finding is further supported by the opposite regulation of the balance between these two pathways by ICI 182,780, that can play an inhibitory and disruptive role in angiogenesis.

# ÍNDICE

<b>INTRODUÇÃO</b>	1
1. A importância da angiogénese na evolução do cancro da mama	3
2. O “switch angiogénico”	5
3. A função do TGF $\beta$	9
4. Sinalização de TGF $\beta$ por Smads	11
5. TGF $\beta$ possui um efeito importante na transição entre as fases de activação e resolução da angiogénese	14
<b>OBJECTIVO</b>	17
<b>PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS</b>	19
1. Reagentes	21
2. Culturas celulares	21
3. Recolha do meio condicionado	22
4. Extração diferencial de proteínas	22
5. Western blot	23
6. Quantificação da intensidade das bandas	24
<b>RESULTADOS</b>	25
<b>I. Estudo da actividade da via de transdução de sinal mediada por TGF<math>\beta</math> na linha celular de carcinoma da mama MCF-7</b>	27
1. A linha celular MCF-7 é sensível à exposição a TGF $\beta$	29
2. A sinalização por Smads em células MCF-7 é sensível ao estado de activação da via estrogénica	31
<b>II. Estudo da actividade da via de transdução de sinal mediada por TGF<math>\beta</math> em HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)</b>	33
1. Cinética da indução da fosforilação de Smad1 em HUVECs	35
2. Cinética da indução da fosforilação de Smad2/3 em HUVECs	36
3. O estado de activação da via estrogénica em MCF-7 interfere na via de transdução de sinal de TGF $\beta$ em HUVECs	38
<b>DISCUSSÃO</b>	41
<b>CONCLUSÕES</b>	53
<b>REFERÊNCIAS</b>	57





## INTRODUÇÃO

---



## 1. A importância da angiogénese na evolução do cancro da mama

A mama é uma glândula sujeita a modulação por estímulos fisiológicos. Encontra-se dividida em cerca de vinte secções chamadas lobos, cada uma delas subdividida em lóbulos. Estas estruturas são constituídas por ductos. Os ductos e lóbulos são interiormente revestidos por uma dupla camada de células: epiteliais e mioepiteliais. Ao longo da vida da mulher, a mama passa por várias alterações: desenvolvimento e puberdade, maturação, diferenciação e lactação, involução e, finalmente, atrofia. (Anderson & Page, *in* Oxford Textbook of Pathology, 1992) Todo este processo é passível de regulação hormonal.

Recentemente, têm sido propostos vários modelos de tumorigénese, isto é, o processo pelo qual células “normais” se transformam em células neoplásicas, através de alterações genéticas. Foram identificados fenómenos iniciadores críticos. Estes incluem a activação de oncogenes, a perda de função de genes supressores tumorais e a desregulação da apoptose. Contudo, além das alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem durante a iniciação, para que ocorra a progressão, é também necessária a satisfação de um outro requisito: o desenvolvimento de neo-vascularização induzida pelo tumor.

Nos capilares normais, as células endoteliais estão permanentemente em contacto com uma membrana basal, rica em laminina, e com uma camada de pericitos que suportam e conferem estabilidade ao vaso. Por oposição, no micro-ambiente do tumor irá formar-se uma rede de vasos relativamente instável e altamente permeável, que é ainda capaz de fornecer nutrientes, mas que facilita o extravasamento de células tumorais e a formação de metástases. (Boudreau & Myers, 2003) Estes vasos sanguíneos são arquiteturalmente diferentes dos vasos normais: possuem formas irregulares, são dilatados, tortuosos, e, por vezes, não estão interligados. Contrariamente ao que se passa nos tecidos normais, em que a densidade vascular é dinamicamente controlada pelas necessidades metabólicas de nutrientes e oxigénio, nos vasos sanguíneos que se formam no micro-ambiente tumoral, o fluxo sanguíneo é irregular, move-se mais lentamente e, por vezes,

oscila em sentidos opostos, o que leva a capilares disfuncionais. (Bergers & Benjamin, 2002)

Através de estudos relativos à embriogénese e desenvolvimento, sabemos que todos os novos vasos sanguíneos começam por ser apenas tubos formados por células endoteliais alinhadas. Os dois mais importantes processos responsáveis pela formação de novos vasos sanguíneos denominam-se vasculogénese e angiogénese. A vasculogénese é a diferenciação primária *in situ* de células progenitoras endoteliais, que, subsequentemente, se organizarão num plexo capilar primário. A angiogénese é o processo biológico no qual novos vasos sanguíneos são formados a partir da vasculatura pré-existente. (Pepper, 1997)

## 2. O “switch angiogénico”

A angiogénese é um fenómeno que ocorre durante a embriogénese, em contextos fisiológicos específicos no adulto saudável, em processos como a cicatrização e a ovulação, e em condições patológicas, como na progressão tumoral. Existem, porém, diferenças importantes no desencadeamento da angiogénese em situações patológicas quando comparado com o que acontece em situações não associadas a uma patologia. No micro-ambiente tumoral, a perda do equilíbrio entre activadores e inibidores da angiogénese desencadeia o “switch angiogénico”. (Figura 1).

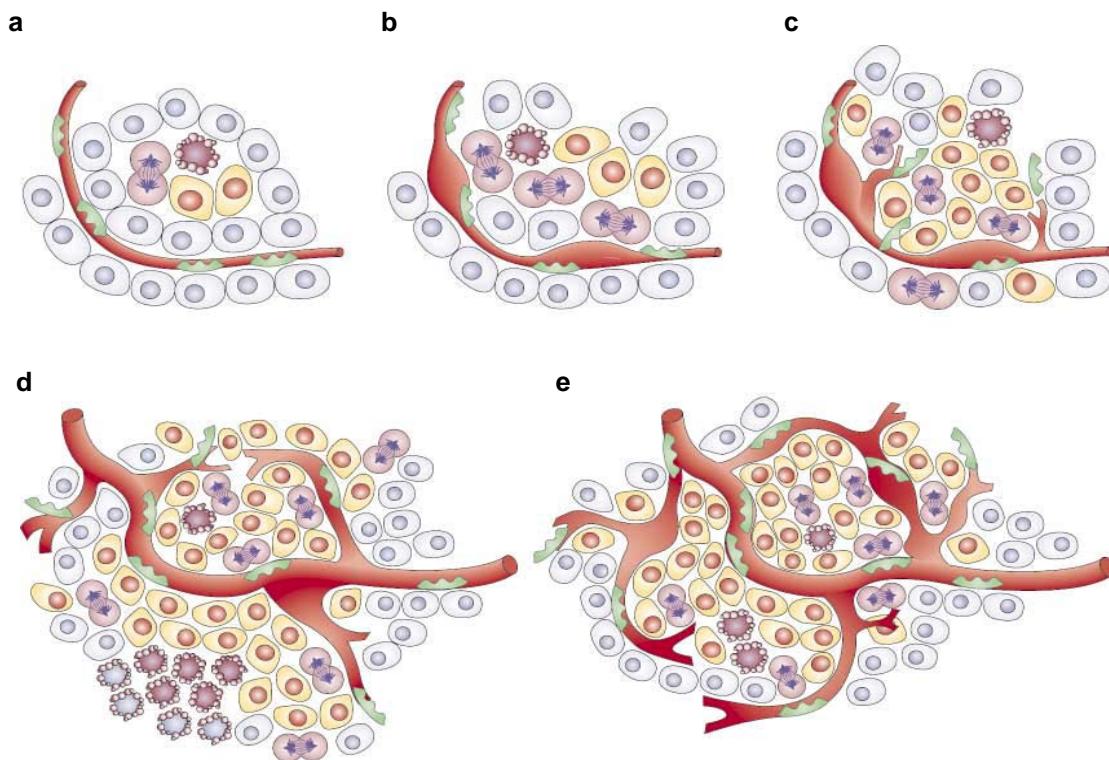


Figura 1: A angiogénese pode ocorrer em diferentes estádios na via de progressão do tumor, dependendo da sua natureza e do micro-ambiente onde se insere. A maioria dos tumores começa a crescer como nódulos avasculares (dormentes) (a) até que a sua progressão chega a um estado de equilíbrio entre células proliferativas e apoptóticas. A iniciação da angiogénese, ou “angiogenic switch”, torna-se essencial para um crescimento exponencial do tumor. Este começa com o destacamento perivascular e a dilatação do vaso (b), seguido do “sprouting” angiogénico (c), formação e maturação de novos vasos, e o recrutamento de células perivasculares (d). A formação dos vasos sanguíneos irá prosseguir, acompanhando o crescimento do tumor. Estes irão alimentar especificamente áreas hipóxicas e necróticas do tumor e provê-lo com nutrientes essenciais e oxigénio (e).

Adaptado de Bergers & Benjamin (2002).

Existem moléculas endógenas com propriedades estimuladoras ou inibidoras da angiogénese. Podem ser produzidas por células tumorais, pelas células do estroma ou do sistema imunitário, ou até serem o resultado da actividade de enzimas produzidas por essas células e que clivam as proteínas da matriz extracelular. (Yancopoulos et *al.*, 2001)

Uma das moléculas com actividade pró-angiogénica mais estudadas é o VEGF (factor de crescimento vascular do endotélio). Esta molécula está presente sob várias isoformas, sendo que muitas delas possuem funções semelhantes. (Ferrara, 1999; Neufeld et *al.*, 1999) O VEGF exerce a sua função biológica através de três receptores distintos: VEGFR1, VEGFR2 e VEGFR3. Estes receptores possuem actividade de tirosina cinase e capacidade para activar uma via de transdução de sinal. (Vaisman et *al.*, 1990)

Contudo, outro tipo de moléculas, com efeitos biológicos opostos, possui também receptores no endotélio vascular. Entre estes, o receptor de tirosina cinase Tie2 é activado pelos ligandos Ang1 a Ang4, que constituem a família das angiopoietinas. (Holash et *al.*, 1999) Enquanto que a sobre-expressão de VEGF, em modelos animais, resulta na formação de vasos imaturos, com maior capacidade de extravasar fluido, a sobre-expressão de Ang1 origina vasos resistentes à troca de fluido com a matriz extracelular, provavelmente devido a uma interacção mais acentuada entre as células endoteliais, pericitos e células do músculo liso. Ang2, por seu lado, actua como um antagonista de Tie2, desestabilizando os vasos. (Ivanovic et *al.*, 2003)

O factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) actua directamente nas células endoteliais, através da activação dos seus receptores, e exerce o papel de modulador morfogénico no desenvolvimento vascular. (Suzigan et *al.*, 2001)

O receptor do factor de crescimento da epiderme, EGFR, encontra-se sobre-expresso em vários tipos de cancro. Em carcinomas invasivos da mama, a expressão de EGFR correlaciona-se com um pior prognóstico. (Soares et *al.*, 2000) Os seus ligandos, EGF e TGF $\alpha$ , activam a sua actividade de tirosina cinase. Drogas

dirigidas contra esta porção do receptor possuem um efeito de supressão da proliferação tumoral e de bloqueio da angiogénese. (Petit et *al.*, 1997)

Recentemente, foi demonstrada uma associação entre a via de transdução de sinal de Notch e a angiogénese mediada por 17 $\beta$ -estradiol. Notch1 e o seu ligando, Jagged1, são positivamente regulados por estrogénio e dão origem a um aumento da densidade de microvasos *in vivo*. O gene de Jagged1 possui elementos responsivos a estrogénio (EREs) imperfeitos. A expressão de Notch1 é ainda capaz de induzir a sobre-expressão de HIF1- $\alpha$ , a subunidade constitutivamente expressa do factor de transcrição induzido por hipoxia. (Soares et *al.*, 2004b)

Várias evidências apoiam, assim, a afirmação de que os estrogénios influenciam a vasculatura. Tanto as células endoteliais como as células de músculo liso que constituem a parede dos vasos sanguíneos possuem receptores de estrogénio. A activação de ER $\alpha$  e ER $\beta$  possui consequências fisiológicas para o vaso uma vez que os estrogénios são potentes vasodilatadores e inibidores da apoptose. As células endoteliais são ainda capazes de produzir estrogénio através da actividade da aromatase, uma enzima necessária para a síntese destas moléculas.

Um número crescente de estudos indica que 17 $\beta$ -estradiol, o estrogénio endógeno predominante, promove a homeostasia das células endoteliais, possuindo um papel decisivo na regulação da angiogénese.

Uma das formas mais eficazes de regulação da angiogénese pelo estrogénio é a indução de vias de transdução de sinal. Estas vias de transdução de sinal encontram-se sob regulação de 17 $\beta$ -estradiol, tanto em linhas celulares de carcinoma mamário humano, dependente de estrogénio (MCF-7) (Soares et *al.*, 2004a), como em células endoteliais (HUVEC) (Soares et *al.*, 2003), que também apresentam receptores de estrogénio. Este efeito implica o 17 $\beta$ -estradiol na regulação da progressão tumoral através de processos de regulação autócrinos (as células do tumor produzem factores que potenciam o seu próprio crescimento e multiplicação) como de mecanismos de indução ou repressão parácrinos (as



células do tumor produzem factores que irão estimular vias de sinalização noutro tipo de células, como as células endoteliais).

Como anteriormente demonstrado, foi identificado um conjunto de genes cujo transcrito se encontrava sob regulação de  $17\beta$ -estradiol. (Soares et al., 2003 e 2004) Para elucidar o papel do estradiol nas células endoteliais, foi também utilizado um anti-estrogénio puro (ICI 182,780), que degrada os receptores de estrogénio. A partir dos resultados obtidos, foram estudados com particular relevância os genes envolvidos na indução de um fenótipo angiogénico. (Soares et al., 2003 e 2004)

Entre os genes escolhidos, o factor de crescimento transformante  $\beta$  (TGF $\beta$ ) surgiu como um dos mais interessantes, já que o seu transcrito é regulado positivamente por  $17\beta$ -estradiol e negativamente por ICI 182,780 em células de carcinoma mamário humano dependentes de estrogénio, as MCF-7 (Soares et al., 2004a); em contrapartida, em células HUVEC, células endoteliais da veia umbilical humana, o transcrito de TGF $\beta$  só é expresso após estimulação por ICI 182,780 (Soares et al., 2003). Tal facto pode indicar um efeito contrastante de TGF $\beta$ , dependente do tipo de célula e dos estímulos a que esta é sujeita.

### 3. A função do TGF $\beta$

Citocinas são um grupo de proteínas regulatórias, de baixo peso molecular, secretadas primordialmente por glóbulos brancos mas também por outras células do organismo, em resposta a estímulos indutores, como, por exemplo, o hormonal. Estas moléculas regulam a intensidade e duração da resposta através da estimulação ou inibição da activação, proliferação e/ou diferenciação de várias células. Também regulam as actividades de secreção de anticorpos e outras citocinas. (Ibelgaufits, COPE 2003)

TGF $\beta$  é uma citocina (Figura 2) sintetizada por macrófagos, linfócitos, células endoteliais, condrócitos, entre outras. Dependendo do tipo e condições celulares, a secreção de TGF $\beta$  pode ser induzida por estímulos distintos como sejam os esteróides, retinóides, factor de crescimento da epiderme (EGF), vitamina D3 e interleucina-1 (IL1).

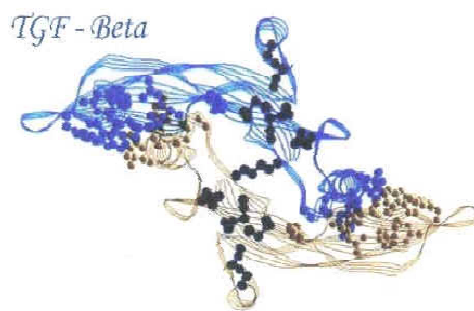


Figura 2: Estrutura tridimensional de TGF $\beta$ 1.

TGF $\beta$  é sintetizado como uma longa molécula precursora, contendo uma sequência-sinal. A latência do complexo de TGF $\beta$  é conferida pela contínua associação não covalente do dímero propéptido, também chamado péptido associado a latência (ou LAP), com o dímero da citocina activa, mesmo após a secreção. Este complexo de propéptido e citocina chama-se pequeno complexo de latência. A este pode associar-se LTBP-1 (proteína ligada a TGF $\beta$  latente), através de ligações bissulfito entre resíduos de cisteína no terceiro domínio do conjunto de oito repetições de cisteína em LTBP-1 e a cisteína 33 do propéptido TGF $\beta$ . A este complexo dá-se o nome de grande complexo de latência. LTBP-1 possui um importante papel na modulação da disponibilidade de TGF $\beta$  activo no meio. (Gualandris et *al.*, 2000) A forma activa e biologicamente madura da citocina só será libertada deste complexo não-covalente através da acção da activação ácida.

TGF $\beta$  possui cinco isoformas conhecidas, todas elas originadas por clivagem proteolítica de moléculas precursoras mais longas. (Ibelgaufts, COPE 2003)

TGF $\beta$  é uma citocina que possui um importante papel como regulador do normal desenvolvimento e função da glândula mamária, bem como no desenvolvimento e progressão de tumores da mama. É um potente inibidor da progressão do ciclo celular em células epiteliais, incluindo as células dos lóbulos e ductos da glândula mamária, e, por isso, controla a proliferação e regressão das células epiteliais durante o desenvolvimento da glândula mamária, mas também durante e após a lactação na glândula adulta. Regula, ainda, uma grande disparidade de funções celulares como a proliferação, diferenciação, migração, síntese de matriz extracelular e hematopoiese, mas está também envolvido em processos biológicos mais complexos como a vasculogénese, cicatrização e angiogénese. (Kretzschmar, 2000)

TGF $\beta$  desempenha um papel complexo na carcinogénese. Em estádios iniciais da carcinogénese, esta citocina desempenha um papel supressor de tumor pois inibe de forma potente o crescimento celular. Em fases posteriores da carcinogénese, as células tumorais tipicamente adquirem resistência a esta inibição do crescimento, começando até a secretar altos níveis de TGF $\beta$ . A sobre-expressão de TGF $\beta$  em carcinomas em estadio avançado é um reflexo do seu papel como promotor tumoral, o qual exerce através de mecanismos parácrinos e autócrinos. (Schwarte-Waldhoff & Schmiegel, 2002)

#### 4. Sinalização de TGF $\beta$ por Smads

TGF $\beta$  exerce a sua função nas células através de mecanismos de transdução de sinal. TGF $\beta$  (ligando) liga-se a receptores do tipo cinases de serina/treonina. A ligação de TGF $\beta$  ao seu receptor tipo II (T $\beta$ RII) fortalece a ligação deste ao receptor tipo I (T $\beta$ RI). O receptor tipo II irá, então, transfosforilar o domínio GS do receptor tipo I, o que resulta na sua activação. (Figura 3) T $\beta$ RI activo desencadeia vários mecanismos de sinalização intracelular, incluindo as vias de Erk e MAPK. (Derynck & Zhang, 2003)

Entre os mensageiros secundários que são activados por TGF $\beta$ , as proteínas Smad desempenham um papel predominante no desencadeamento das actividades biológicas de TGF $\beta$ . As proteínas Smad constituem uma família de factores de transcrição que medeiam a sinalização por TGF $\beta$ . O nome Smad provém dos membros fundadores desta família, a proteína MAD (Mothers Against Decapentaplegic) da *Drosophila melanogaster* e a proteína SMA (Small body size) de *Caenorhabditis elegans*.

Podem ser classificadas em três classes: R-Smads (Smads

reguladas por receptores), co-Smad (Smad co-mediadora) e I-Smads (Smads inibitórias). Estas proteínas possuem regiões conservadas, designadas domínio MH1 (domínio de homologia 1 à proteína Mad de *Drosophila*), na região N-terminal, e domínio MH2, na região C-terminal. Entre os dois domínios encontra-se uma região “linker”. Em todas as classes de Smads, o domínio MH2 é altamente

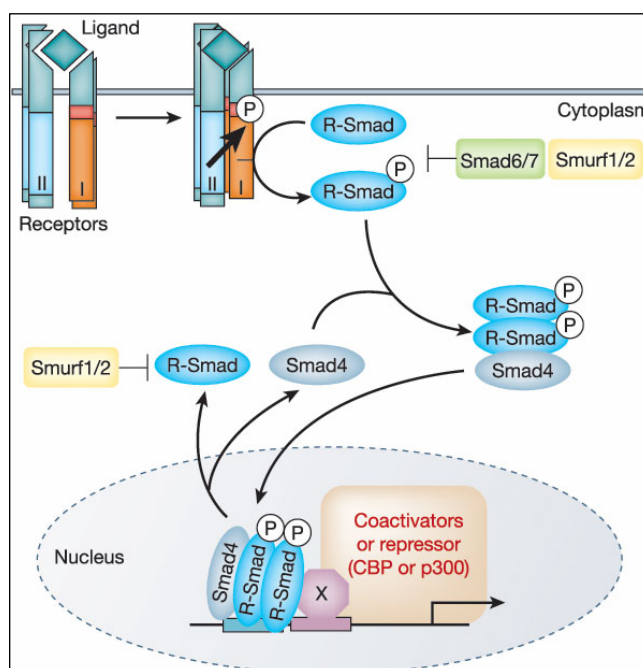


Figura 3: Representação esquemática do mecanismo de transdução de sinal de TGF $\beta$ .

Adaptado de Derynck & Zhang (2003)

conservado, por oposição ao que se passa em relação ao domínio MH1, que embora se encontre conservado entre R-Smads e co-Smad, é altamente divergente nas I-Smads (Smads 6 e 7).

As R-Smads (Smads 1, 2, 3, 5 e 8) actuam como mensageiros secundários. Quando se encontra na sua forma activa, o domínio cinase de T $\beta$ RI fosforila os dois últimos resíduos de serina no motivo Ser-Ser-X-Ser, que se encontra no domínio MH2 de R-Smads. É também este o domínio responsável pela formação de um complexo heteromérico com Smad4 ou co-Smad. (Figura 4) Este complexo irá ser translocada entre o citoplasma e o núcleo da célula. (Massagué, 2000) Os sinais de localização nuclear (NLS) no domínio MH1 de R-Smads e Smad4 desempenham um papel predominante na translocação do complexo heteromérico para o núcleo, enquanto que os sinais de exportação nuclear (NES) que foram identificados na região “linker” de co-Smad são responsáveis pela devolução do heterómero ao citoplasma.

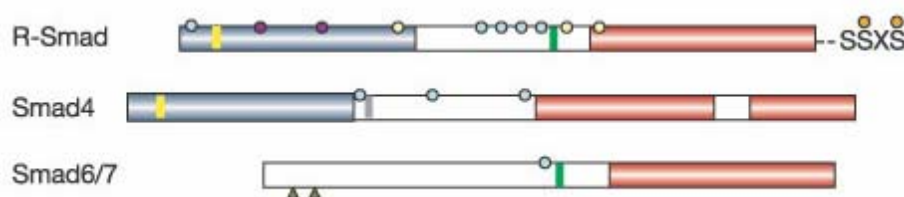


Figura 4: Estrutura de Smads. A azul encontra-se o domínio MH1, que possui funções de ligação ao ADN e interacção com outros factores de transcrição. A vermelho está representado o domínio MH2, que possui funções de interacção com os receptores, oligomerização de Smads e activação da transcrição. A laranja estão marcados os locais de fosforilação pelo receptor, a amarelo o NLS e a cinza o NES. A verde encontram-se marcados os locais de ligação de Smurfs. Adaptado de Derynck & Zhang (2003).

A activação continuada do receptor mantém o complexo no núcleo. Sem estimulação pelo ligando, R-Smads localizam-se primordialmente no citoplasma. A localização citoplasmática de factores de transcrição no seu estado basal, isto é, na ausência de estímulo, assegura o seu rápido acesso aos receptores na membrana plasmática. Para as Smads, que necessitam de fosforilação mediada pelo receptor para se converterem ao seu estado activo, a localização citoplasmática representa uma oportunidade para a activação e não um

impedimento da sua função. Quando no núcleo, os heterómeros de R-Smad-co-Smad interagem com factores de transcrição, co-activadores e co-repressores que regulam a activação de genes-alvo pelas Smads. A exportação de Smads do núcleo para o citosol é importante para a sua reciclagem em sucessivas voltas de desactivação e reactivação. Este processo mantém a sinalização dependente da contínua activação do receptor e permite a desactivação ou degradação dos mensageiros quando a transdução de sinal finalizar. (Xu & Massagué, 2004)

Este processo pode ser inibido pelas Smads inibitórias, I-Smads, que impedem a fosforilação de R-Smads, competindo com estas pela ligação a T $\beta$ RI. Esta actividade inibitória de I-Smads é coadjuvada pela acção de proteínas denominadas Smurfs, ligases de ubiquitina, que intervêm na degradação do complexo heteromérico, ligando-se a R-Smads. As Smurfs também se ligam a I-Smads, induzindo a sua exportação do núcleo, onde habitualmente se localizam, para o citoplasma, permitindo, assim, a sua associação com T $\beta$ RI. (Massagué, 2000)

## 5. TGF $\beta$ possui um papel importante na transição entre as fases de activação e resolução da angiogénese

Tal como já antes referimos, TGF $\beta$  tornou-se um objecto de estudo, não apenas pelo facto da sua expressão ser diferentemente regulada pela activação ou inibição da via estrogénica, mas também porque parece desempenhar um importante papel na transição entre as duas fases da angiogénese.

A angiogénese ocorre em duas fases distintas, sequenciais e de efeitos opostos: fase de activação e fase de resolução. (Figura 5)

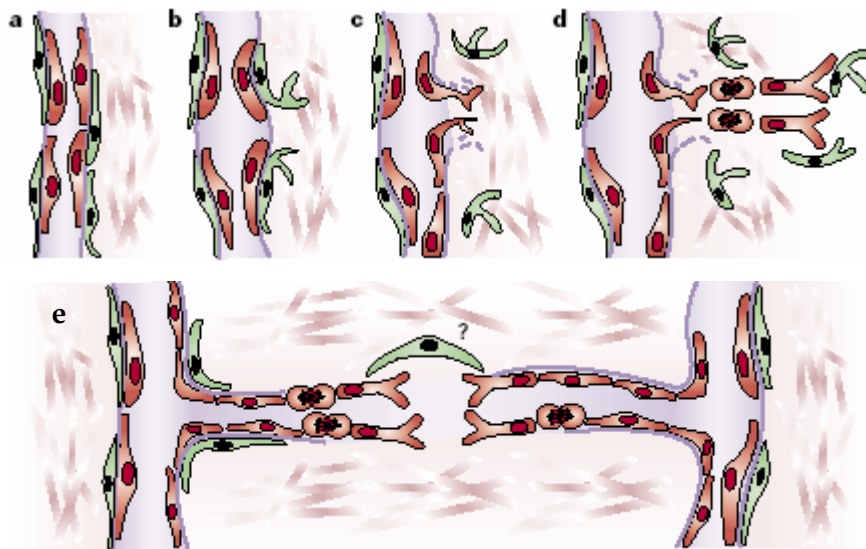


Figura 5: Os vasos sanguíneos têm origem em capilares ou vénulas pré-existent no tumor. (a) No início, os pericitos destacam-se e os vasos sanguíneos dilatam; estes fenómenos precedem a degradação da membrana basal e da matriz extracelular (b). Isto permite às células endoteliais iniciarem a sua migração para o espaço perivascular, na direcção do estímulo angiogénico produzido pela célula tumoral (c). As células endoteliais proliferam, umas atrás das outras, e, presumivelmente, são guiadas pelos pericitos (d). As células endoteliais aderem umas às outras, criando um lúmen, acompanhado pela formação de uma nova membrana basal e ligação de pericitos. Finalmente, os novos vasos sanguíneos irão fundir-se uns com os outros, criando novos sistemas circulatórios no interior do tumor (e).

Adaptado de Bergers & Benjamin (2002)

Durante a primeira fase, a sobre-expressão de metaloproteinases de matriz (MMPs), dá origem à degradação de uma estrutura que confere estabilidade aos vasos e que se denomina membrana basal. Isto permite às células endoteliais migrarem e proliferarem para a matriz extra-celular, formando novos vasos. Nesta

fase, a produção de VEGF é essencial pois trata-se da molécula com maior actividade quimiotáctica e proliferativa sobre as células endoteliais.

A segunda fase caracteriza-se pela ocorrência de fenómenos de sentido oposto: cessa a proliferação e migração das células endoteliais e a membrana basal é reconstruída. São recrutadas células mesenquimais para o local de formação do novo vaso. Subsequentemente, estas células diferenciam-se em pericitos e células de músculo liso e dispõem-se em redor do vaso recém-criado. (Bergers & Benjamin, 2002) Por vezes, em alguns tumores sólidos, a fase de maturação da angiogénese não chega sequer a ocorrer. Esta é uma das razões pelas quais os vasos sanguíneos, cuja formação é induzida pelo tumor, apresentam um fenótipo tão distinto dos vasos que se formam durante a angiogénese fisiológica, tais como aqueles que se formam no endométrio durante o ciclo menstrual.

Durante as duas fases da angiogénese, são expressas proteínas com efeitos antagónicos no endotélio. O balanço na concentração disponível destes factores e o modo como actuam nos vasos irá determinar a transição entre as duas fases da angiogénese. Em contrapartida, a expressão e actuação de TGF $\beta$  no endotélio dá-se durante as duas fases da angiogénese mas possui efeitos opostos. Este efeito deve-se ao facto de, nas células endoteliais, ao contrário do que se passa na maioria dos outros tipos de células, TGF $\beta$  ser capaz de sinalizar, através de um mecanismo genómico dependente de Smads, através de duas vias distintas, caracterizadas pela activação de duas formas distintas de T $\beta$ RI.

Nos mamíferos, encontra-se presente apenas uma forma de T $\beta$ RII mas existem duas formas bem descritas de receptor tipo I, designadas como ALK-1 (activin receptor-like kinase 1) e ALK5 (activin receptor-like kinase 5). Enquanto que ALK-5 se encontra ubiquamente expresso em células responsivas a TGF $\beta$ , ALK-1 é preferencialmente expresso em células endoteliais.

A afinidade do ligando a ALK-5 é maior e a ligação estabelecida mais duradoura mas, assim que começa a activação de ALK-1, ou seja, quando a concentração de ligando aumenta até se tornar disponível para este receptor, a



sinalização por esta via torna-se predominante em relação à anterior, chegando mesmo a inibir os efeitos mediados por ALK-5.

Diferentes interações combinatórias entre diferentes tipos de receptor tipo II e receptor tipo I no complexo tetramérico receptor permitem a ligação diferencial de ligandos ou a sinalização diferencial em resposta ao mesmo ligando, como é o caso da sinalização de TGF $\beta$  em células endoteliais. Assim, a formação do complexo receptor formado por duas moléculas de T $\beta$ RII e duas moléculas de ALK-5, irá activar a sinalização mediada por Smad2 e Smad3; por outro lado, se o complexo tetramérico receptor for formado por duas moléculas de T $\beta$ RII e duas moléculas de ALK-1, a sinalização irá ser desencadeada através da fosforilação de Smad1 e Smad5. (Derynck & Zhang, 2003)

É consensual que estas duas vias de sinalização exercem efeitos opostos nas células endoteliais. A controvérsia reside na definição de qual das vias é responsável por cada fenótipo. Enquanto que alguns autores postulam que ALK1 está envolvido na fase de resolução da angiogénese (Seki et al., 2003; Lamouille et al., 2002; Oh et al., 2000), outros afirmam que ALK1 activa sinais que levam a fenómenos relacionados com a fase de activação da angiogénese (Lebrin et al., 2004; Goumans et al., 2003a, 2003b e 2002).

Assim, dependendo do tipo de sinalização que é activada, e tendo em consideração os seus fenótipos antagónicos, TGF $\beta$  provoca um efeito bifásico e dependente de dose na migração das células endoteliais, o que lhe confere um papel determinante na transição entre as fases de activação e de resolução da angiogénese.

## OBJECTIVO

---

O objectivo deste estudo centra-se no estudo da possível regulação da via de transdução de sinal de TGF $\beta$  por estrogénios, com a finalidade de esclarecer o papel desta citocina na indução da angiogénese.



## **PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

---



## 1. Reagentes

TGF $\beta$ 1 humano recombinante (ref. 240-B, da R&D Systems®) foi reconstituído com uma solução estéril de 4 mM de HCl, contendo 1mg/ml de BSA (albumina do soro bovina), até uma concentração final de 1 $\mu$ g/ml, e armazenado a -80°C.

17 $\beta$ -estradiol (ref. 614076, da Sigma®) e ICI 182,780 (fornecido por AstraZeneca, Portugal) foram dissolvidos em etanol absoluto. Estas substâncias foram armazenadas a -20°C e adicionadas ao meio de cultura, na ausência de soro e a fresco, a uma dose máxima de 0,1 % (v/v) de etanol.

Os anticorpos utilizados em western blot foram: anti-p-Smad2/3 (ref. sc-11769, da Santa Cruz Biotechnology®) e anti-p-Smad1 (ref. 566411, da Calbiochem®). O primeiro detecta Smad3 fosforilada nos resíduos Ser<sup>433</sup> e Ser<sup>435</sup> e correspondente Smad2 fosforilada. O segundo reconhece a proteína Smad1, de 65 a 66 KDa, duplamente fosforilada nos resíduos Ser<sup>463</sup> e Ser<sup>465</sup>.

## 2. Culturas celulares

A linha celular humana de cancro da mama dependente de estrogénio, MCF-7 (ATCC) foi cultivada em meio RPMI 1640 (ref. 72400-021, da Gibco®), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (FBS), previamente inactivado a 50°C, durante 1 hora, e com 1% (v/v) de penicilina/estreptomicina (ref. 15140-122, da Gibco®).

As células endoteliais da veia umbilical humana (HUVEC) foram adquiridas à Cascade Biologics® (ref. C-003-5C) e mantidas em meio de cultura 200 (ref. M-200-500, da Cascade Biologics®), suplementado com LSGS Kit (Low Serum Growth Supplement Kit, ref. S-003-K, da Cascade Biologics®). O meio de cultura suplementado possui então 2% (v/v) de FBS, 1 $\mu$ g/ml de hidrocortisona, 10ng/ml de factor de crescimento da epiderme humano, 3ng/ml de factor de crescimento de fibroblastos básico (bFGF) e 10 $\mu$ g/ml de heparina.

As culturas celulares foram mantidas a 37°C numa atmosfera humidificada com 5% de CO<sub>2</sub>. Todos os tratamentos às células em cultura, quer com TGFβ, quer com 17β-estradiol, ICI182,780 ou meio condicionado foram efectuados numa fase da progressão da cultura em que esta se encontrava a cerca de 80% da confluência, e após 24 horas de privação em meio de cultura sem soro.

### **3. Recolha do meio condicionado**

As células MCF7 em cultura foram tratadas, por um período de 24 horas, com etanol absoluto ou veículo, 17β-estradiol a uma concentração final de 10<sup>-8</sup>M, ICI 182,780 a uma concentração final de 10<sup>-9</sup>M, ou ambos. O meio de cultura foi recolhido, forçado a passar através de microfiltros estéreis de 0,2μm de malha, e armazenado a -80°C.

### **4. Extração diferencial de proteínas**

As células aderentes em cultura foram recolhidas por raspagem no meio de cultura, e centrifugadas. O pellet obtido foi lavado por duas vezes em PBS estéril e logo ressuspenso em tampão A. Este tampão é constituído por uma solução de 10 mM HEPES, 10mM KCl e 1,5mM MgCl<sub>2</sub> que é suplementada, a fresco, com DTT (ref. 43817 da Sigma®), PMSF (ref. 93482, da Sigma®), leupeptina (ref. L2884, da Sigma®) e aprotinina (ref. A3428, da Sigma®).

Após centrifugação, o pellet obtido foi ressuspenso em tampão A'. Este tampão é constituído pela mesma solução base do tampão A e suplementado com os mesmos inibidores de proteases. Contudo, para este tampão exercer a sua acção de extracção das proteínas citosólicas sem danificar o núcleo, necessita também da adição de molibdato de sódio, βglicerofosfato, fluoreto de sódio, ortovanadato de sódio e p-nitro-fenilfosfato (inibidores de cinases e fosfatases). Este é também o único tampão ao qual se adiciona NP-40, um detergente que vai desestabilizar os lípidos da membrana citoplasmática.

Esta solução é incubada em gelo por 10 minutos, com homogeneização ocasional. Ao sobrenadante obtido após centrifugação (fracção citosólica) adicionou-se tampão D. A base deste tampão é constituída por uma solução de 20 mM HEPES, 50mM KCl, 0,2mM EDTA e 20% glicerol, ao qual se adiciona, a fresco, DTT e PMSF). Esta é uma solução que permite o seguro armazenamento das proteínas a baixa temperatura. O extracto é então armazenado a -80°C.

O pellet obtido previamente foi ressuspendido em tampão C (solução de 20mM HEPES, 420mM NaCl, 1,5mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2mM EDTA e 25% glicerol, suplementado, a fresco, com todos os suplementos adicionados ao tampão A', excepto NP-40) e incubado em gelo por 10 minutos, com homogeneização ocasional da solução. Após centrifugação, ao sobrenadante obtido, que constitui a fracção nuclear, adicionou-se tampão D. O extracto foi armazenado a -80°C.

## **5. Western blot**

Após quantificação das proteínas, calculou-se o volume de amostra necessário para correr sempre a mesma quantidade de proteína em cada gel, de modo a ser possível fazer comparações.

As amostras são preparadas, desnaturadas a 95°C por 5 minutos, e corridas num gel de poliacrilamida. Após a separação das proteínas segundo a sua massa molecular, estas são transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Hybond ECL, ref. RPN78D, da Amersham Biosciences®). A eficácia da transferência é avaliada por coloração com reagente de Ponceau (Ponceau S Solution, ref. P-7170, da Sigma®).

A actividade da peroxidase endógena, passível de comprometer a revelação, é bloqueada através da incubação da membrana, durante 1 hora e a 4°C, com uma solução tampão contendo 5% de BSA (albumina do soro bovina, ref. 05473, da Sigma®) e 0,5% de Tween-20 (ref. P5927, da Sigma®). A incubação com o anticorpo primário é feita a 4°C durante 16 horas.



A revelação é feita através da reacção quimioluminescente de ECL com a peroxidase do anticorpo secundário, captada como um sinal por películas Hyperfilm (ref. RPN3103K, da Amersham Biosciences®).

## **6. Quantificação da intensidade das bandas**

O software Quantity One da Biorad® foi utilizado para quantificar a intensidade das bandas em cada Western blot.

Após revelação das películas, o sinal específico da ligação do anticorpo ao epítipo da proteína de interesse aparece como uma banda escura. A imagem digitalizada pode então ser analisada pelo software que irá avaliar a intensidade do sinal de cada banda. Para ser possível obter um resultado com o menor ruído, foi escolhido um método de subtracção da intensidade do fundo. Este método local irá retirar à intensidade de cada banda, a intensidade que é lida no fundo. Deste modo, é possível obter uma boa relação entre a intensidade das bandas numa mesma experiência e entre diferentes experiências, através da normalização da intensidade das bandas à intensidade da banda relativa ao controlo.

## **RESULTADOS**

---



## **I. Estudo da actividade da via de transdução de sinal mediada por TGF $\beta$ na linha celular de carcinoma da mama MCF-7**

A primeira fase do trabalho consistiu na determinação da actividade da via de transdução de sinal mediada por TGF $\beta$  em células de cancro da mama dependentes de estrogénio: a linha celular MCF-7.

Numa primeira experiência, células MCF-7 em cultura foram estimuladas com diferentes concentrações de TGF $\beta$ . Os extractos proteicos, divididos em fracção citosólica e nuclear, foram sujeitos a western blot com o objectivo de determinar a concentração mínima de TGF $\beta$  que produzisse um efeito significativo de indução da fosforilação das R-Smads (Smad2 e Smad3).

Numa segunda experiência, células MCF-7 em cultura foram tratadas com 17 $\beta$ -estradiol ou com o anti-estrogénio puro ICI 182,780. Os extractos proteicos resultantes foram submetidos a western blot e os níveis de intensidade das bandas correspondentes a p-Smad2/3 foram comparados, com o objectivo de determinar uma possível interferência destes compostos na via de transdução de sinal de TGF $\beta$ .



## 1. A linha celular MCF-7 é sensível à exposição a TGFβ

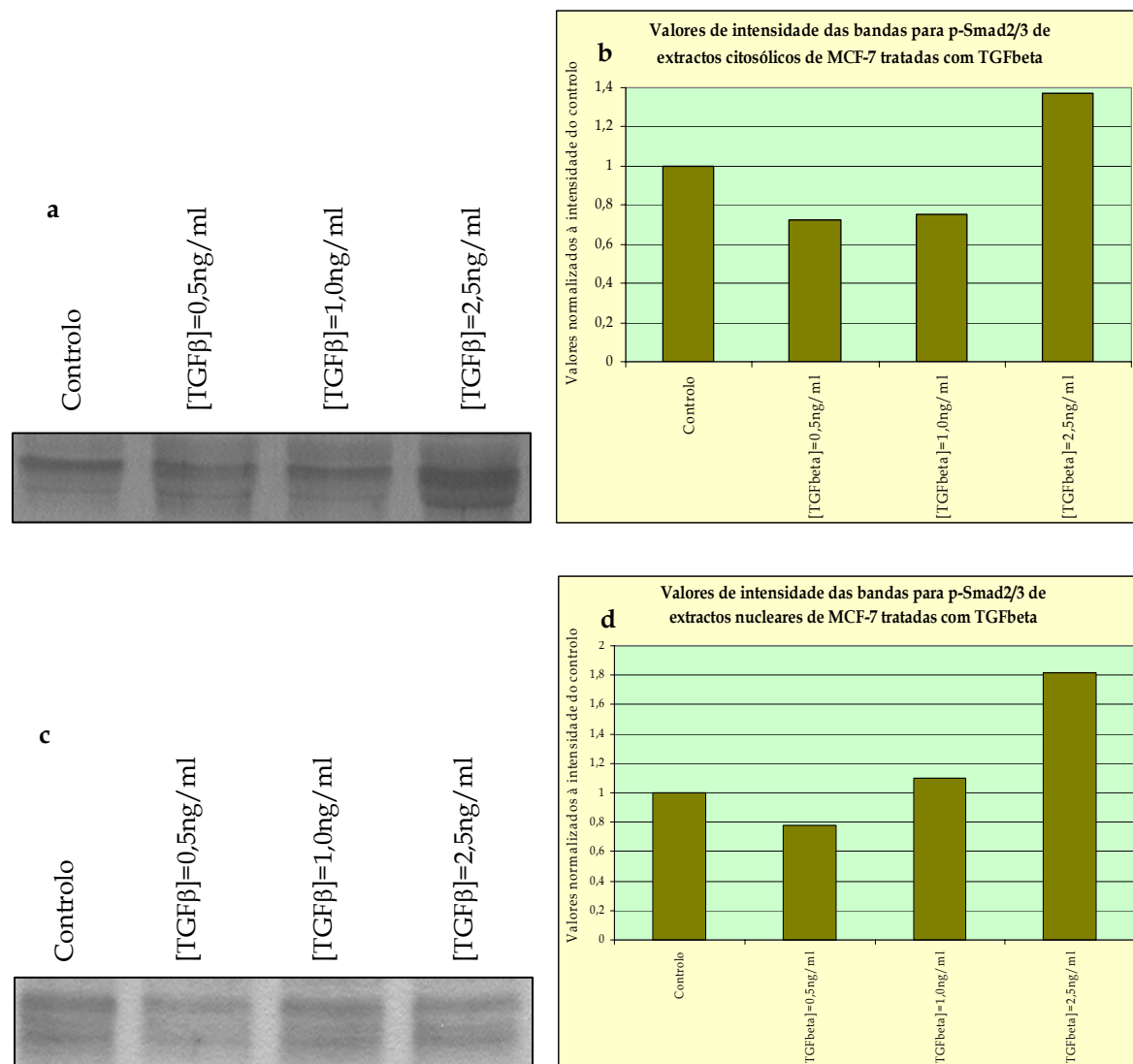


Figura 6: Western blot dos extractos citosólicos (a) e nucleares (c) de MCF-7, após 3 horas de exposição aos tratamentos mencionados e respectiva representação gráfica da intensidade das bandas do Western blot para p-Smad 2/3 dos extractos citosólicos (b) e nucleares (d) de MCF-7. A intensidade das bandas encontra-se normalizada relativamente à intensidade do controlo.

As nossas observações, representadas na figura 6, indicam que a estimulação de células MCF-7 com uma concentração de TGFβ de 0,5ng/ml, ou de 1,0ng/ml não estimula significativamente os níveis de fosforilação de Smad2 e Smad3.

Os valores de intensidade das bandas observados para os extractos citosólico e nuclear de MCF-7, estimuladas com TGFβ a uma concentração de 1,0ng/ml, não produziram resultados consistentes entre as duas fracções proteicas analisadas, já que induziram um ligeiro aumento da intensidade da fosforilação no núcleo mas

os níveis de fosforilação de Smad2/3 no citosol permaneceram abaixo dos níveis dos extractos de MCF-7 não tratadas.

O estímulo de MCF-7 com 0,5ng/ml de TGF $\beta$  levou a uma diminuição na intensidade das bandas do western blot relativas a p-Smad2/3. A extensão desta diminuição ronda os 25% em ambos os extractos analisados.

Contudo, a estimulação destas células com TGF $\beta$  a uma concentração de 2,5ng/ml, revela um aumento na intensidade das bandas correspondentes a Smad2 e Smad3 fosforiladas, tanto ao nível do citosol como do núcleo. No citosol, esta estimulação é da ordem de 35% acima da do controlo, enquanto que no núcleo a diferença observada é muito mais evidente e traduz-se num aumento de intensidade superior a 80%, comparativamente com o extracto de MCF-7 não tratadas.

## 2. A sinalização por Smads em células MCF-7 é sensível ao estado de activação da via estrogénica

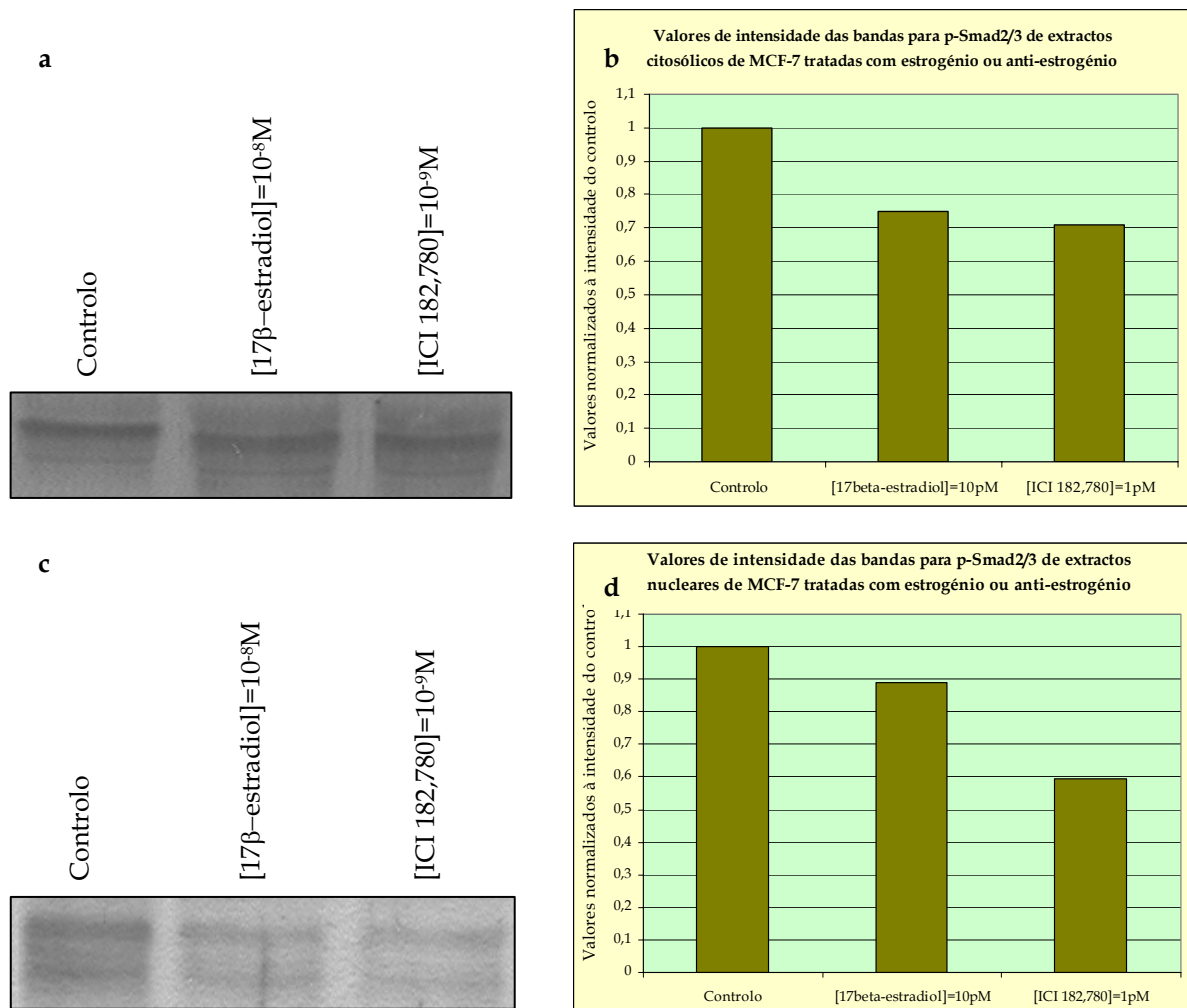


Figura 7: Western blot dos extractos citosólicos (a) e nucleares (c) de MCF-7, após 3 horas de exposição aos tratamentos mencionados e respectiva representação gráfica da intensidade das bandas do Western blot para p-Smad 2/3 dos extractos citosólicos (b) e nucleares (d) de MCF-7. A intensidade das bandas encontra-se normalizada relativamente à intensidade do controlo.

Tal como é demonstrado na figura 7, nas células tratadas com ICI 182,780 verificou-se, relativamente às células não tratadas, uma inibição de aproximadamente 30% nos níveis de fosforilação de Smad2 e Smad3 no citosol e quase 40% na intensidade da fosforilação de Smad2 e Smad3 no núcleo.

Nas células tratadas com 17β-estradiol, os níveis de Smad2/3 fosforiladas decresceram de forma menos significativa: cerca de 25% no citosol mas apenas cerca de 10% no núcleo.





## **II. Estudo da actividade da via de transdução de sinal mediada por TGF $\beta$ em HUVECs (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)**

Em células endoteliais, a sinalização por TGF $\beta$  é efectuada através do estímulo da fosforilação de dois conjuntos de R-Smads distintos: Smad2 e Smad3 (fosforiladas após estímulo por ALK5), e Smad1 e Smad5 (fosforiladas após estímulo por ALK1).

Com o objectivo de determinar a actividade de cada uma destas vias em células endoteliais, células HUVEC em cultura foram estimuladas com TGF $\beta$ , a uma concentração de 2,5ng/ml (escolhida de acordo com os estudos efectuados com células MCF-7). Estas células foram expostas a TGF $\beta$  durante intervalos de tempo diferentes, passados os quais foram preparados extractos proteicos diferenciais. A análise, por western blot, destes extractos, possibilitou a determinação de uma cinética de activação distinta entre as duas vias analisadas.

Finalmente, as células HUVEC em cultura foram tratadas com meio condicionado de MCF-7. Este meio foi obtido através da recolha do meio de cultura de células MCF-7 que, previamente, haviam sido expostas ao estímulo de 17 $\beta$ -estradiol, ICI 182,780, ou apenas etanol (veículo), por 24 horas, com o objectivo de estudar a possível regulação da via de TGF $\beta$  por estrogénios, de modo a determinar o papel desta citocina na regulação da angiogénese.



## 1. Cinética da indução da fosforilação de Smad1 em HUVECs

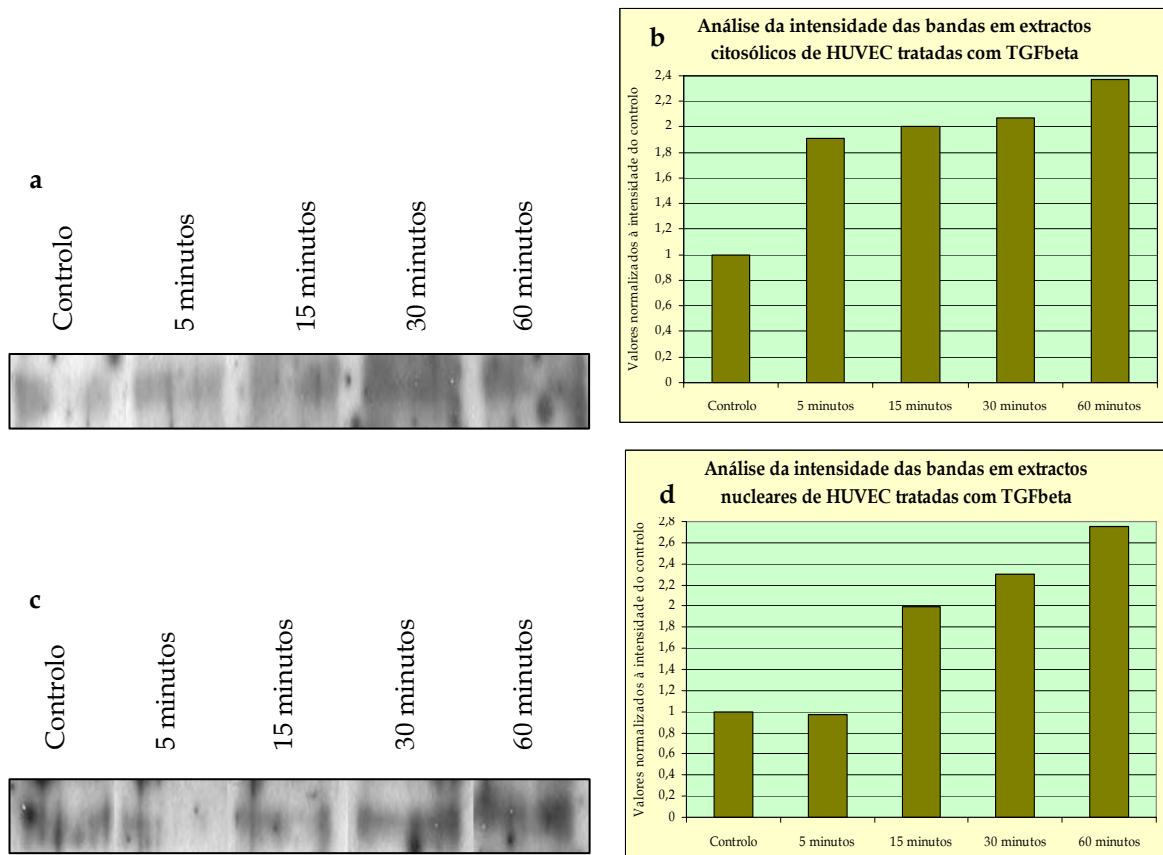


Figura 8: Western blot para p-Smad1 dos extractos citosólicos (a) e nucleares (c) de HUVEC, tratadas com TGFβ a uma concentração de 2,5ng/ml e respectiva representação gráfica da intensidade das bandas dos extractos citosólicos (b) e nucleares (d). A intensidade das bandas encontra-se normalizada relativamente à intensidade do controlo.

A fosforilação de Smad1 possui uma cinética consistentemente crescente ao longo do tempo, verificando-se o valor de intensidade da fosforilação máxima no tempo mais tardio estudado, os 60 minutos. (Figura 8)

Os valores de intensidade das bandas indicam que, nos primeiros 5 minutos após adição do tratamento, a translocação para o núcleo parece ser ligeiramente retardada em relação ao aumento da intensidade da fosforilação no citosol.

Os valores da intensidade das bandas nunca são significativamente inferiores ao do controlo para p-Smad1.

## 2. Cinética da indução da fosforilação de Smad2/3 em HUVECs

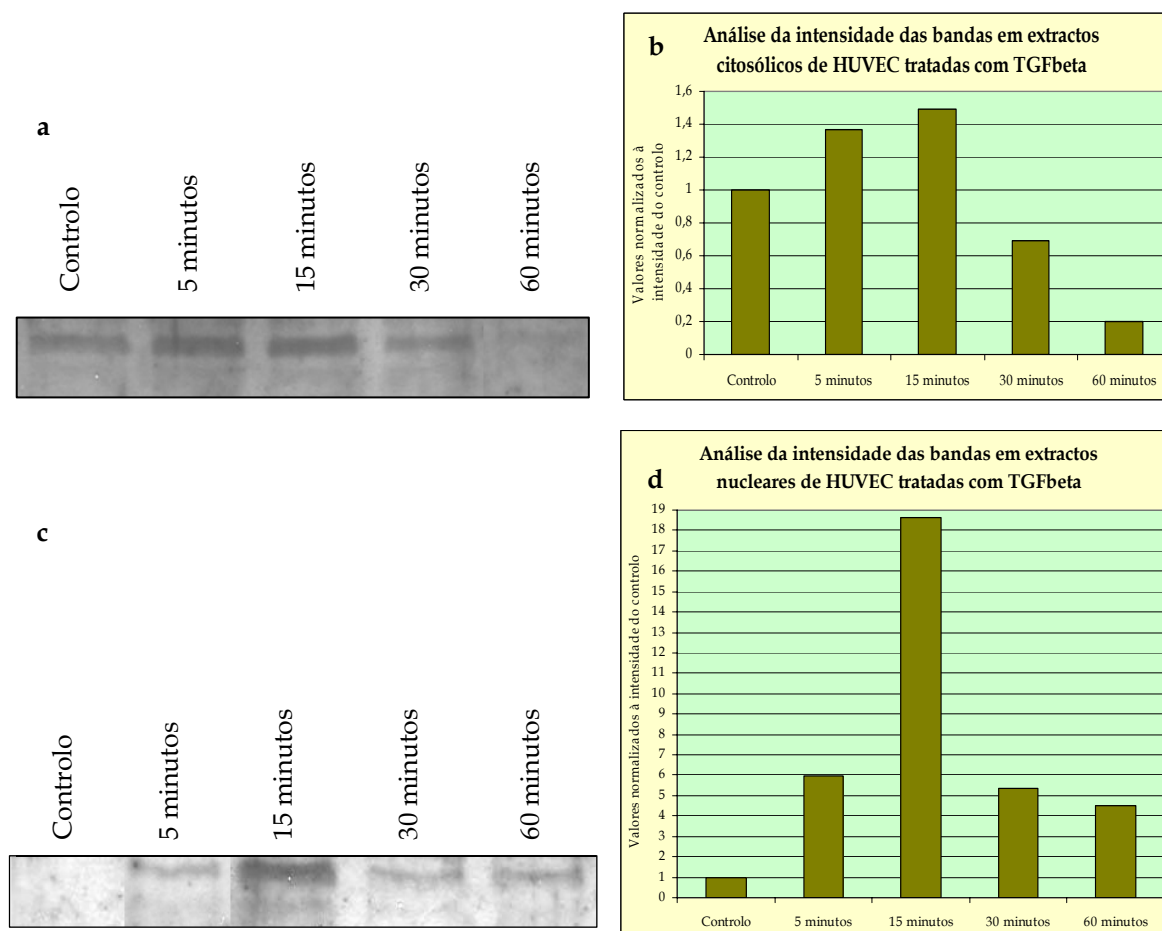


Figura 9: Western blot para p-Smad2/3 dos extractos citosólicos (a) e nucleares (c) de HUVEC, tratadas com TGFβ a uma concentração de 2,5ng/ml e respectiva representação gráfica da intensidade das bandas dos extractos citosólicos (b) e nucleares (d). A intensidade das bandas encontra-se normalizada relativamente à intensidade do controlo.

Tal como demonstrado na figura 9, uma concentração elevada de TGFβ produz um rápido aumento nos níveis de Smad2/3 fosforiladas, tanto no citosol como no núcleo.

No citosol (Figura 9a e 9b), o nível basal de Smad2 e Smad3 fosforiladas é já bastante elevado, pelo que as diferenças na intensidade das bandas não são tão acentuadas. Ainda assim, conseguimos determinar uma tendência nas diferenças de intensidade das bandas que em tudo se assemelha à observada no núcleo. Nesta situação, passado o pico da fosforilação que acontece aos 15 minutos, os

níveis de Smad2/3 fosforiladas decrescem abruptamente para níveis inferiores aos da situação controlo (sem estímulo por TGF $\beta$ ).

No núcleo (Figura 9c e 9d), onde a presença de Smad2/3 fosforiladas é residual, o aumento dos níveis de fosforilação é evidente, tendo-se observado um aumento de mais de 18 vezes na intensidade da fosforilação relativamente ao controlo, após 15 minutos de tratamento. Após este pico de fosforilação, que se dá na mesma cinética que no citosol, os níveis de fosforilação de Smad2/3 nunca descem abaixo do controlo, mesmo após 60 minutos de tratamento.

### 3. O estado de activação da via estrogénica em MCF-7 interfere na via de transdução de sinal de TGF $\beta$ em HUVECs

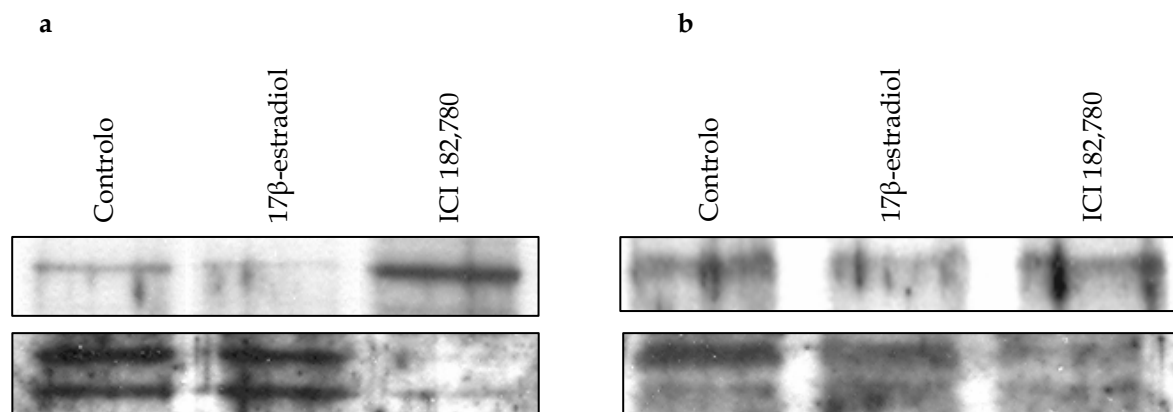


Figura 10: Western blot dos extractos citosólicos (a) e nucleares (b) de HUVEC, tratadas com meio condicionado de MCF-7. MCF-7 foram estimuladas por 24 horas com 17 $\beta$ -estradiol, ICI 182,780 ou apenas etanol (controlo). O meio condicionado recolhido foi utilizado para tratar as células HUVEC por 24 horas. Os painéis superiores referem-se aos western blot para p-Smad1 e os painéis inferiores representam o western blot para p-Smad2/3 (foram utilizados os mesmos extractos).

O meio condicionado de células MCF-7, em que a via estrogénica não foi estimulada ou inibida, estimula a fosforilação das duas vias de sinalização mediadas por Smads. Nesta situação, a estimulação da fosforilação de Smad2/3 predomina em relação à fosforilação de Smad1. (Figura 10)

A activação ou inibição da via estrogénica produz um efeito marcante no estado de fosforilação de R-Smads, alterando o equilíbrio entre as duas vias de sinalização antagonistas que co-existem em células HUVEC. (Figuras 10 e 11)

O meio condicionado proveniente de células MCF-7 tratadas com 17 $\beta$ -estradiol produz uma alteração nos níveis de fosforilação de R-Smads de efeito contrário àquela que é estimulada pelo meio condicionado de células MCF-7 tratadas com ICI 182,780, uma droga definida como anti-estrogénio puro e cujo mecanismo de acção consiste na competição pela ligação e consequente degradação dos receptores de estrogénio.

O meio condicionado proveniente de células MCF-7 onde a via estrogénica foi estimulada por 17 $\beta$ -estradiol, induz, nas HUVECs, um pequeno aumento (cerca de 5% para os extractos citosólicos e 7% para os extractos nucleares) na intensidade

das bandas relativas a p-Smad2/3, quando a comparação é feita com o que acontece quando HUVECs são estimuladas com o meio condicionado proveniente de MCF-7 não tratadas. Em contrapartida, conforme podemos observar pela análise da figura 11, os níveis de p-Smad1 decrescem de modo muito significativo quando HUVECs são expostas a este mesmo estímulo: esta diminuição ronda os 25% no núcleo e mais que 65% no citosol.

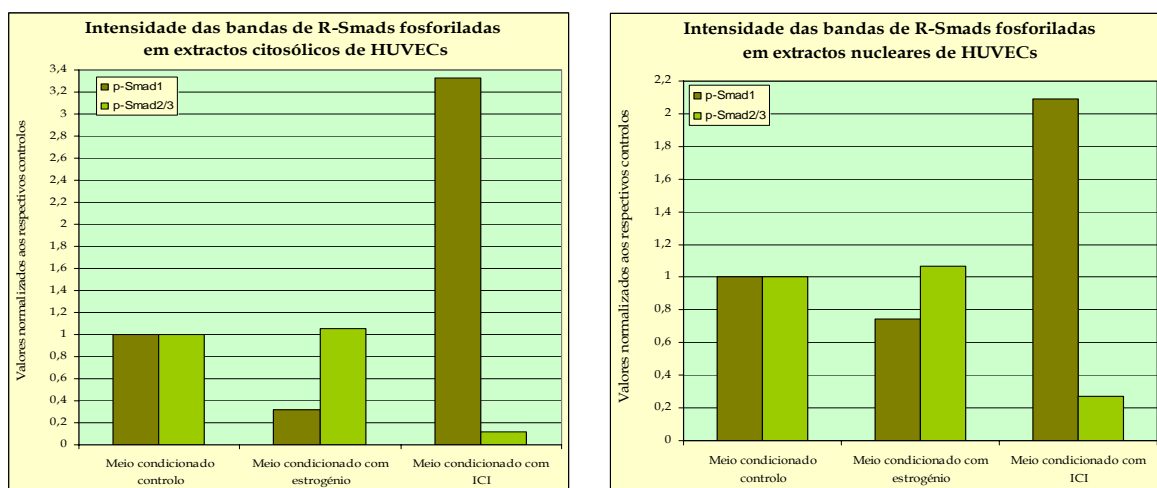


Figura 11: Comparação da intensidade da fosforilação de Smad2/3 com a intensidade da fosforilação de Smad1 dos extractos citosólicos (esquerda) e nucleares (direita) de HUVEC, tratadas com meio condicionado proveniente de MCF-7. Esta linha celular dependente de estrogénio foi estimulada por 24 horas com 17 $\beta$ -estradiol, ICI 182,780 ou apenas etanol (controle). O meio condicionado recolhido foi utilizado para tratar as células HUVEC por 24 horas.

Tanto nos extractos citosólicos como nos extractos nucleares, o meio condicionado proveniente de células tratadas com ICI 182,780, estimula, nas HUVECs, a indução de mecanismos que levam ao aumento dos níveis de p-Smad1, enquanto leva à marcada diminuição na intensidade das bandas correspondentes a p-Smad2/3. Os níveis de intensidade das bandas para p-Smad2/3 decrescem para cerca de 12% dos níveis do controle, em extractos citosólicos, e rondam os 27% da intensidade do controle nos extractos nucleares. Por oposição, os níveis de fosforilação de Smad1, medidos por intensidade comparativa das bandas em western blot, apresentam um notório aumento: triplicam no citosol e sobem para o dobro no núcleo.





## DISCUSSÃO

---



O factor de crescimento transformante beta (TGF- $\beta$ ) é essencial na regulação de processos celulares e fisiológicos, tais como proliferação, diferenciação, migração, sobrevivência, angiogénese e tolerância imunológica (Elliot & Blobe, 2005). Alterações nas vias de sinalização do TGF- $\beta$  têm sido descritas em diferentes tipos de neoplasias humanas, com consequente repercussão nestes processos fisiológicos e implicações na tumorigénese. (Miyazono et al., 2003)

O mecanismo geral de sinalização do TGF $\beta$  dá-se através da ligação directa a receptores transmembranares. O TGF $\beta$  interage directamente com o receptor T $\beta$ RII. Esta ligação a T $\beta$ RII pode acontecer sem o auxílio da endoglina (ou CD105) mas é por esta estabilizada. Uma vez ligado ao TGF $\beta$ , T $\beta$ RII recruta, liga-se e transfosforila o T $\beta$ RI, estimulando a sua actividade de serina/treonina cinase. Esta actividade é necessária para fosforilar as R-Smads, as quais se ligam a Smad4. O complexo resultante transloca para o núcleo e interage de forma específica com factores de transcrição para actuar especificamente na regulação de vários genes responsivos ao TGF $\beta$ .

A sinalização por TGF $\beta$  é regulada pelo nível e duração da activação dos receptores de TGF $\beta$ , o que dá origem ao contínuo tráfico núcleo-citoplasmático de Smads. (Inman et al., 2002) Níveis elevados de TGF $\beta$  fazem decrescer as propriedades de adesão e aumentar a motilidade e actividade proteolítica de células neoplásicas, o que resulta num fenótipo mais agressivo para estes tipos de neoplasia. (Maehara et al., 1999) Células de cancro da mama reagem à adição de TGF $\beta$ 1 exógeno com um aumento no seu comportamento de invasividade e capacidade de originar metástases *in vivo*, mesmo que *in vitro* a sua taxa de proliferação diminua. (Tobin et al., 2002)

No nosso trabalho, inicialmente demonstrámos que em células de carcinoma da mama humano dependentes de estrogénio (MCF-7), o 17 $\beta$ -estradiol aumenta a transcrição do TGF $\beta$  cerca de seis vezes em relação ao normal. Por outro lado, o anti-estrogénio puro ICI 182,780 bloqueia esta expressão. As concentrações de TGF $\beta$  a que foram expostas as células MCF-7 foram seleccionadas com base em estudos da medição do nível da proteína no plasma de pacientes com cancro

(Knabbe et al., 1996; Ivanovic et al., 2003; Buck et al., 2004). Nestes estudos, a presença de níveis mais elevados de TGF $\beta$ 1 no plasma de doentes com cancro mostrou estar correlacionada com um pior prognóstico devido à maior probabilidade de existência de metástases. Existe também uma correlação entre a progressão do cancro da mama e a resposta dos pacientes à terapia com níveis mais elevados de TGF $\beta$  no plasma. (Jeruss et al., 2003)

No trabalho aqui apresentado, só a exposição a uma concentração de 2,5ng/ml de TGF $\beta$  foi capaz de estimular a fosforilação de Smad2/3 em MCF-7 a um nível significativamente acima do controlo. Concentrações inferiores de TGF $\beta$  exógeno tiveram mesmo um efeito inibitório na actividade da via de transdução (Figura 6), talvez pela sua capacidade de potenciar mecanismos de auto-regulação negativa.

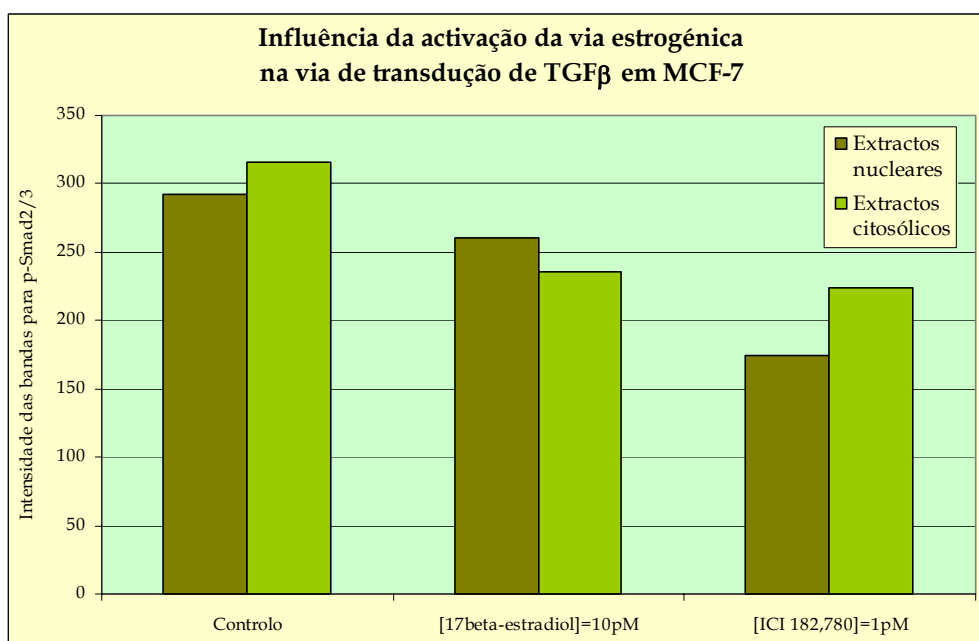


Figura 12: A actividade da via de transdução de sinal de TGF $\beta$  em células de cancro da mama dependentes de estrogénio é influenciada pela activação ou bloqueio da via estrogénica.

Um dos resultados mais intrigantes que obtivemos, foi a diminuição na intensidade de fosforilação de Smad2/3 em células MCF-7 tratadas com 17 $\beta$ -estradiol. (Figura 12) Estaríamos à espera de um aumento nos níveis de fosforilação de Smad2/3 relativos ao aumento de expressão de TGF $\beta$ . Contudo, como a determinação da concentração de TGF $\beta$  activo secretado para o meio não

foi efectuada, podemos apenas especular que a concentração presente não seria a necessária para estimular a fosforilação. Outra possibilidade reside no facto de, para ser capaz de secretar maiores quantidades de TGF $\beta$  para o meio, a célula ter que alterar o seu metabolismo; se tal for o caso, a via de transdução de TGF $\beta$  por Smads poderá ser preterida em função de outros mecanismos de sinalização não genómicos e com respostas celulares mais rápidas que também podem ser activados por esta citocina. O tratamento com ICI 182,780, o anti-estrogénio puro, inibiu de forma significativa o nível de fosforilação detectável de Smad2/3.

Tendo em consideração estes dados, podemos deduzir que o efeito de TGF $\beta$  talvez se exerça primordialmente de forma parácrina e não autócrina, neste modelo. Assim, debruçámo-nos no estudo dos efeitos que esta citocina poderia exercer na angiogénese.

Um dos mecanismos essenciais para o desenvolvimento de uma neoplasia é a formação de novos vasos sanguíneos. Para crescer além de 1 a 2 mm<sup>3</sup> e superar as necessidades de nutrientes e oxigénio, as células neoplásicas necessitam induzir a formação de vasos através da angiogénese, ou seja, formação de novos vasos a partir de células endoteliais pré-existentes. TGF $\beta$  é uma das múltiplas citocinas que regulam a angiogénese.

TGF $\beta$  pode funcionar como uma molécula pró ou anti-angiogénica *in vitro*; entretanto há evidências preponderantes que suportam o papel pró-angiogénico do TGF $\beta$  *in vivo*. (Pepper, 1997) Entre elas, destacamos experiências de deleção de alguns genes desta via em ratinhos, tais como TGF $\beta$ 1 (Dickson et al., 1995), T $\beta$ RII (Oshima et al., 1996) e T $\beta$ RI (Larsson et al., 2001), que consistentemente dão origem a angiogénese anormal nestes animais. Foram também identificados dois receptores do TGF $\beta$  específicos para células endoteliais: endogлина e ALK-1; estes receptores desempenham funções primordiais na angiogénese e mutações nos genes que os codificam podem ser deletérias ou causar doenças vasculares como a teleangiectasia hemorrágica hereditária (Johnson et al., 1996). Um dos marcadores mais específicos na distinção histopatológica entre os vasos sanguíneos normais e os vasos induzidos pelo tumor é a endogлина. A sua expressão nas células

endoteliais é bastante aumentada durante a angiogénese tumoral e parece poder distinguir entre células endoteliais quiescentes e células em proliferação (Burrows et al., 1995) Finalmente, TGF $\beta$  induz a expressão de VEGF, o mais potente factor pró-angiogénico conhecido. (Sánchez-Elsner et al., 2001)

Apesar de estar bem estabelecido o papel do TGF $\beta$  na angiogénese, a sinalização nas células endoteliais parece ser diferente da sinalização clássica descrita em células epiteliais. Trabalho prévio do nosso grupo demonstrou que o TGF $\beta$  é necessário como mediador da estimulação angiogénica induzida por estrogénios (Soares et al., 2004a). Contudo, não se conhece com profundidade os efeitos do estrogénio na actividade da via de transdução de sinal do TGF $\beta$ . Em células endoteliais, o TGF $\beta$  activa duas vias distintas: através dos receptores T $\beta$ RII e ALK5, activa as Smads 2 e 3 (esta via é comum a outros tipos de células, nomeadamente as epiteliais) e a via através do T $\beta$ RII e ALK1, activa as Smads 1 e 5. Estas duas vias têm efeitos opostos na proliferação e migração de células endoteliais. (Goumans et al., 2002; Lamouille et al., 2002) O balanço da sinalização entre estas vias regula a biologia das células endoteliais através da activação (aumento da proliferação e migração) e maturação (diminuição da proliferação e migração) destas células nas diferentes fases da angiogénese (Oh et al., 2000; Goumans et al., 2003a). Estes efeitos opostos provavelmente explicam os resultados contraditórios que se têm obtido em estudos *in vitro* que demonstram tanto uma actividade pró como anti-angiogénica para o TGF $\beta$ .

Nas células endoteliais utilizadas em nosso estudo, HUVECs, demonstramos que o TGF $\beta$  induz cinéticas distintas de fosforilação das R-Smads. Os nossos resultados demonstram que a amplitude da variação na intensidade da fosforilação de R-Smads é maior na fracção nuclear que na citosólica, o que é consistente em proteínas com a função de factores de transcrição.

A observação da figura 13 permite-nos concluir que a fosforilação das Smads 2 e 3 é um fenómeno rápido e transiente, enquanto a fosforilação da Smad1 é um fenómeno mais progressivo e mais prevalente. Esta cinética distinta pode traduzir o balanço das diferentes vias de sinalização do TGF $\beta$  nas células endoteliais.

Cinética semelhante também é observada em outras células endoteliais, tais como as MEECs (mouse embryonic endothelial cells) (Goumans et *al.*, 2002). Esta observação é consistente com o modelo pelo qual a sinalização por TGF $\beta$  possui duas fases distintas: uma mais sensível ao estímulo e mais rápida a responder, em que predomina a via de sinalização por ALK5, e uma seguinte em que a sinalização por ALK1 supera a sinalização por ALK5 e começa até a inibi-la.

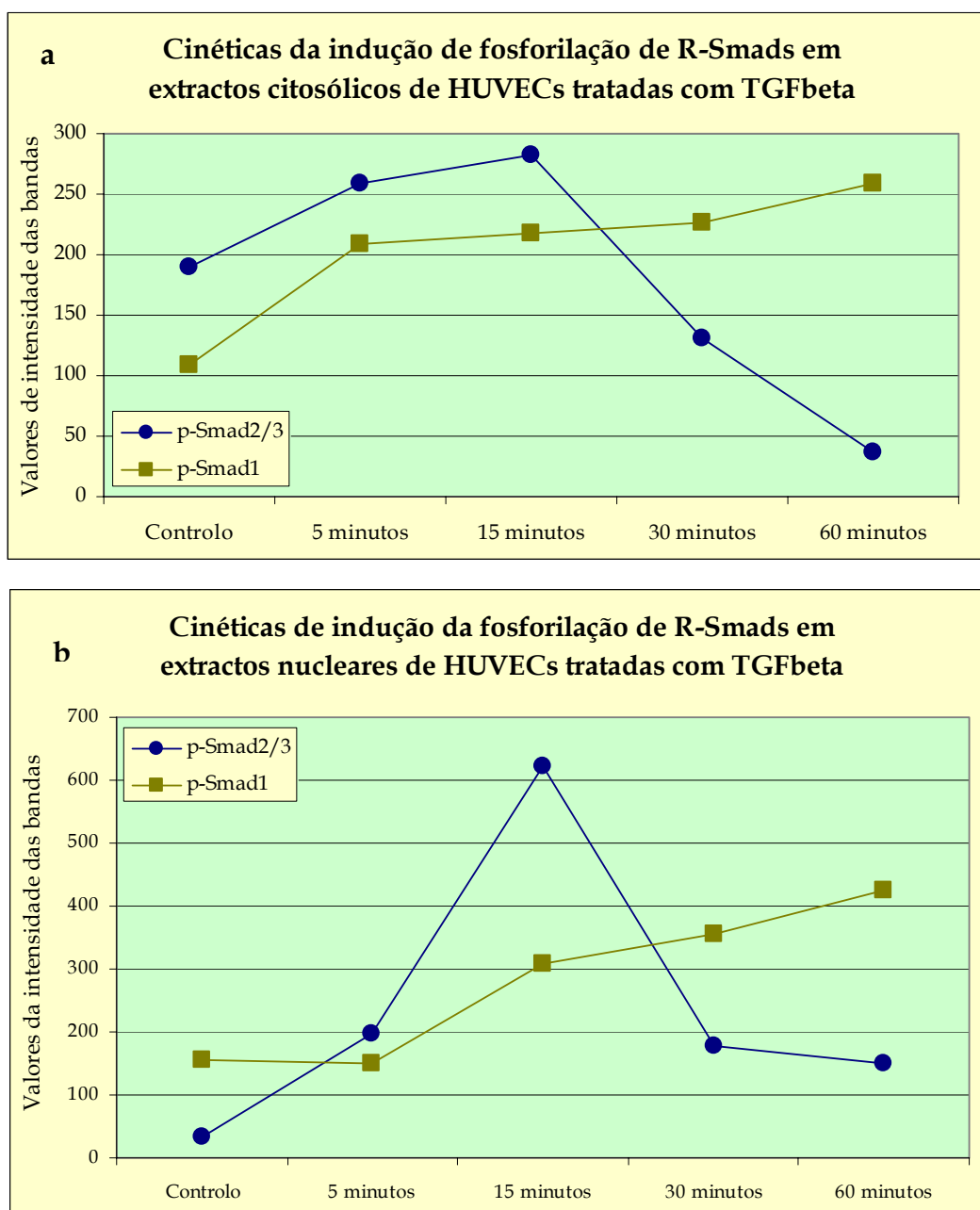


Figura 13: Comparação da cinética da indução da fosforilação de Smad2/3 com a cinética da indução da fosforilação de Smad1 dos extractos citosólicos (a) e nucleares (b) de HUVEC, tratadas com TGF $\beta$  a uma concentração de 2,5ng/ml.



Nas células HUVEC que estudámos, a sinalização por ALK5, traduzida na intensidade das bandas de Smad2/3 fosforiladas, é predominante até aos 15 minutos de exposição à estimulação pelo ligando. Entre os 15 e os 30 minutos, o equilíbrio inverte-se e passa a predominar a sinalização por ALK1, traduzida na intensidade das bandas relativas a Smad1 fosforilada. O facto de os níveis de fosforilação de Smad2/3 no núcleo nunca se situarem abaixo daqueles medidos para HUVECs não estimuladas com TGF $\beta$ , por oposição ao que se observa no citosol, poderá ter a sua explicação no mecanismo de retenção de Smad2 e Smad3 fosforiladas no núcleo, enquanto houver estimulação pelo ligando. Este mecanismo impossibilita a reciclagem de Smad2 e Smad3 e a sua translocação de volta para o citosol.

Tendo já estabelecido que o estado de activação da via estrogénica não parece exercer o seu efeito de uma modo autócrino em células MCF-7, considerámos a possibilidade desta via de transdução ser dependente da via estrogénica mas de um modo parácrino. Assim, as células HUVEC não foram expostas directamente a estrogénios ou anti-estrogénios, mas antes tratadas com o meio condicionado proveniente de células responsivas a estrogénio, as MCF-7.

O meio condicionado de células MCF-7 para as quais não introduzimos qualquer alteração no estado de activação da via estrogénica (controlo), foi utilizada para tratar HUVECs em cultura. Os extractos proteicos diferenciais analisados deram-nos uma primeira indicação que as duas vias de sinalização paralelas por Smads continuam a co-existir nestas células. Nesta situação, o equilíbrio em que se encontram pende para a predominância da via que leva à fosforilação de Smad2/3 sobre a via que tem como efeito a fosforilação de Smad1 (Figura 14), o que veio confirmar os resultados que já havíamos obtido com o estudo da cinética destas duas vias (Figura 13).

Quando tratadas com meio condicionado proveniente de células MCF-7, previamente estimuladas com 17 $\beta$ -estradiol, as células endoteliais HUVECs mostram diminuição acentuada da fosforilação da Smad1. Tal facto pode representar um desequilíbrio das duas vias sinalizadoras do TGF $\beta$ , já que, embora

não significativo, há um aumento da fosforilação das Smads 2 e 3 o que pode resultar num predomínio da via ALK5 sobre a ALK1. Assim, podemos dizer que a activação da via estrogénica potencia ainda mais o desequilíbrio entre a intensidade da sinalização pelas duas vias paralelas de Smads, tendo o seu efeito primordial na inibição da via T $\beta$ RII/ALK1, mais que na estimulação da via T $\beta$ RII/ALK5.

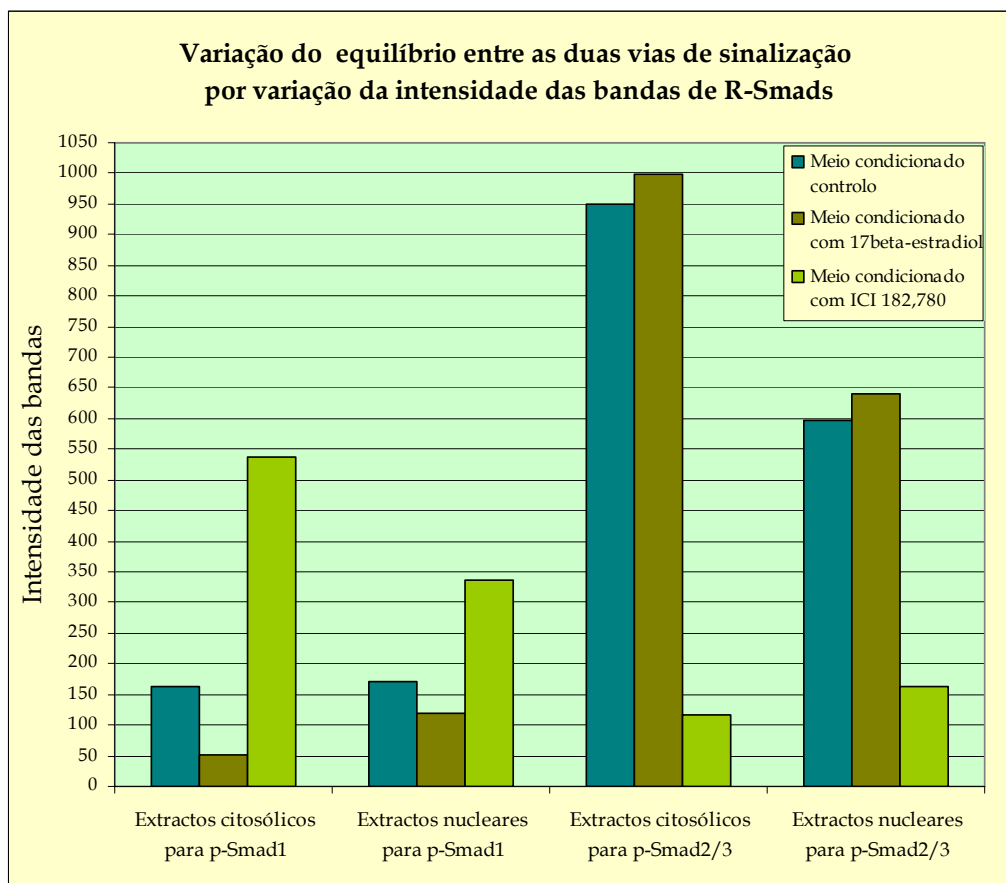


Figura 14: O meio condicionado recolhido de MCF-7, após 24 horas de exposição destas células a 17 $\beta$ -estradiol, ICI 182,780 ou etanol (veículo), é utilizado para tratar células HUVEC em cultura. Os extractos proteicos diferenciais obtidos após 24 horas de tratamento foram sujeitos a western blot para a detecção tanto de p-Smad2/3 como de p-Smad1.

Paralelamente, o meio condicionado proveniente de células MCF-7 tratadas com ICI 182,780 interfere no equilíbrio entre estas duas vias no sentido oposto, estimulando a fosforilação de Smad1. Este efeito é ainda mais notório uma vez que se observa uma inibição da via paralela, ou seja, existe inibição da fosforilação de Smad2/3, conforme demonstrado na figura 14.

Embora não seja surpreendente que o meio condicionado proveniente de células MCF-7 tratadas com estrogénio interfira nas vias de sinalização do TGF $\beta$ , o facto de que o meio condicionado proveniente destas mesmas células tratadas com ICI 182,780, embora de forma oposta, mas também estimulando fosforilação de uma via e bloqueio de outra, provocando um desequilíbrio, parece ser bastante interessante. Alguns autores (Buck et *al.*, 2004; Knabbe et *al.*, 1996) demonstraram que o ICI 182,780 pode estimular igualmente a secreção de TGF $\beta$  na sua forma activa em células MCF-7. Este facto pode conduzir a uma interpretação diversa dos resultados obtidos, para os quais a dose biologicamente disponível é regulada não só a nível da transcrição mas também a nível da activação, por quebra da ligação com LAP ou LTBP-1. Sendo a afinidade por ALK-5 maior, a fosforilação de Smad2/3 é reduzida mas não completamente abolida, até porque, para a sinalização por ALK-1 prosseguir com sucesso, é necessária a activação prévia da actividade cinase de ALK-5. (Goumans et *al.*, 2003a) Deste modo, este anti-estrogénio puro pode ter uma função na regulação da disponibilidade biológica desta citocina, que, por si só, é suficiente para alterar o equilíbrio entre as duas vias de sinalização em HUVECs.

Entretanto não se pode, com os resultados obtidos até ao momento, descartar um efeito directo desta droga sobre as vias de sinalização do TGF $\beta$ , independentemente da presença do ligando. Assim, a indução, em HUVECs, de mecanismos de sinalização pró-apoptóticos, como a sobre-expressão da caspase 9 (Soares et *al.*, 2003) pode levar a uma tentativa de compensação pela célula através de outras vias. Sabemos que os genes regulados pela via de ALK1, em HUVECs, não são os mesmos que sofrem regulação pela via de ALK5. A activação da via de ALK-1 está intrinsecamente relacionada com a promoção de mecanismos de auto-regulação negativa, como a sobre-expressão de Smad6, Smad7, Id1 e endoglin em HUVECs, genes que codificam para proteínas que regulam a direcção e intensidade da sinalização depois de esta já ter sido iniciada. Por seu turno, a activação da via de ALK-5 leva à sobre-expressão de PlGF e LTBP1, entre outros, que codificam para proteínas com a função de regular a sinalização ao nível da

disponibilidade de TGF $\beta$ , e ainda antes de este se ligar aos receptores na célula. (Ota et *al.*, 2002)

Desta forma, os nossos resultados demonstram que o estrogénio interfere com as vias de sinalização do TGF $\beta$ , com promoção de fosforilação das Smads 2 e 3. A inibição da formação de vasos pelo ICI 182,780 demonstrado por Soares et *al.*, 2003 e 2004a, pode, então, ser justificado pelo facto desta droga interferir na sinalização do TGF $\beta$  mediada por estrogénios.



## CONCLUSÕES

---



- A via de sinalização de TGF $\beta$  por Smads, em células MCF-7, encontra-se funcional e responde ao estímulo da adição do ligando, através de um aumento nos níveis de fosforilação de Smad2 e Smad3, quando a concentração deste no meio se apresenta nos mesmos níveis dos observados no plasma de pacientes com cancro da mama.
- A via de sinalização de TGF $\beta$ , em células MCF-7 dependentes de estrogénio, é influenciada pela activação ou bloqueio da via estrogénica.
- Em HUVECs, TGF $\beta$  estimula a sinalização por Smads através de duas vias distintas.
- A cinética de activação dessas duas vias é diferente: a fosforilação das Smad2 e Smad3 é um fenómeno rápido e transiente, enquanto a fosforilação da Smad1 é um fenómeno mais progressivo e mais prevalente.
- A activação da via estrogénica potencia ainda mais o desequilíbrio entre a intensidade da sinalização pelas duas vias paralelas de Smads, tendo o seu efeito primordial na inibição da via T $\beta$ RII/ALK1, mais que na estimulação da via T $\beta$ RII/ALK5.
- Por outro lado, o meio condicionado proveniente de células MCF-7 tratadas com ICI 182,780 interfere no equilíbrio entre estas duas vias no sentido oposto, estimulando a fosforilação de Smad1. Este efeito é ainda mais notório uma vez que se observa uma inibição da via paralela, ou seja, existe inibição da fosforilação de Smad2/3. Esta condição pode favorecer a hipótese de que as vias do TGF $\beta$  envolvidas em angiogénese podem estar sob controlo do estrogénio.





## **REFERÊNCIAS**

---



**Anderson T & Page D**, The breast. In: McGee J, Isaacson P & Wright N, editors. *Oxford Textbook of Pathology*, Nova Iorque, Oxford University Press, 1992, p. 1643-1681.

**Bergers G & Benjamin L** (2002) Tumorigenesis and the angiogenic switch, *Nature Reviews Cancer*, **3**: 401-410.

**Boudreau N & Myers C** (2003) Breast cancer-induced angiogenesis: multiple mechanisms and the role of the microenvironment, *Breast Cancer Research*, **5**: 140-146.

**Buck M, Pfizenmaier K & Knabbe C** (2004) Antiestrogens induce growth inhibition by sequential activation of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase and Transforming Growth Factor- $\beta$  pathways in human breast cancer cells, *Molecular Endocrinology*, **18**: 1643-1657.

**Burrows F, Derbyshire E, Tazzari P, Amlot P, Gazdar A, King S, Letarte M, Vitetta E & Thorpe P** (1995) Up-regulation of endoglin on vascular endothelial cells in human solid tumours: Implications for diagnosis and therapy, *Clinical Cancer Research*, **1**: 1623-1634.

**Derynck R & Zhang Y** (2003) Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- $\beta$  family signaling, *Nature*, **425**: 577-584.

**Dickson M, Martin J, Cousins F, Kulkarni A, Karlsson S & Akhurst R** (1995) Defective haematopoiesis and vasculogenesis in transforming growth factor- $\beta$ 1 knock out mice, *Development*, **121**: 1845-1854.

**Elliot R & Blobe G** (2005) Role of transforming growth factor beta in human cancer, *Journal of Clinical Oncology*, **23**: 2078-2093.

**Ferrara N** (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects, *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **237**: 1-30.

**Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Rosendahl A, Sideras P & Dijke P** (2002) Balancing the activation state of the endothelium via two distinct TGF- $\beta$  type I receptors, *The EMBO Journal*, **12**: 1743-1753.

**Goumans MJ, Valdimarsdottir G, Itoh S, Lebrin F, Larsson J, Mummery C, Karlsson S & Dijke P** (2003a) Activin receptor-like kinase (ALK)1 is an antagonistic mediator of lateral TGF $\beta$ /ALK5 signaling, *Molecular Cell*, **12**: 817-828.

**Goumans MJ, Lebrin F & Valdimarsdottir G** (2003b) Controlling the angiogenic switch: A balance between two distinct TGF- $\beta$  receptor signaling pathways, *Trends in Cardiovascular Medicine*, **13**: 301-307.

**Gualandris A, Annes J, Arese M, Noguera I, Jurukovski V & Rifkin D** (2000) The latent transforming growth factor-  $\beta$ -binding protein-1 promotes in vitro differentiation of embryonic stem cells into endothelium, *Molecular Biology of the Cell*, **11**: 4295-4308.

**Holash J, Wiegand S & Yancopoulos G** (1999) New model of tumor angiogenesis: dynamic balance between vessel regression and growth mediated by angiopoietins and VEGF, *Oncogene*, **18**: 5326-5362.

**Ibelgaufts H** (versão 10.3, Julho 2003) COPE - Cytokines Online Pathfinder Encyclopaedia <http://copewithcytokines.de/cope.cgi>

**Inman G, Nicolas F & Hill C** (2002) Nucleocytoplasmic shuttling of Smads 2, 3 and 4 permits sensing of TGF-beta receptor activity, *Molecular Cell*, **10**: 283-294.

**Ivanovic V, Todoric-Rakovic N, Demajo M, Neskovic-Konstantinovic Z, Subota V, Ivanisevic-Milovanovic O & Nikolic-Vukosavljevic D** (2003) Elevated plasma levels of transforming growth factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression, *European Journal of Cancer*, **39**: 454-461.

**Jeruss J, Sturgis C, Rademaker A & Woodruff T** (2003) Down-regulation of activin, activin receptors and Smads in high-grade breast cancer, *Cancer Research*, **63**: 3783-3790.

**Johnson D, Berg J, Baldwin M, Gallione C, Marondel I, Yoon S, Stenzel T, Speer M, Pericak-Vance M, Diamond A, Guttmacher A, Jackson C, Attisano L, Kucherlapati R, Porteous M & Marchuk D** (1996) Mutations in the activin receptor-like kinase 1 gene in hereditary haemorrhagic telangiectasia type 2, *Nature Genetics*, **13**: 189-195.

**Knabbe C, Kopp A, Hilgers W, Lang D, Muller V, Zugmaier G & Jonat W** (1996) Regulation and role of TGF $\beta$  production in breast cancer, *Annals of the New York Academy of Science*, **784**: 263-276.

**Kretzschmar M** (2000) Transforming growth factor- $\beta$ /SMAD signaling defects and cancer, *Breast Cancer Research*, **2**: 107-115.

**Lamouille S, Mallet C, Feige J & Bailly S** (2002) Activin receptor-like kinase 1 is implicated in the maturation phase of angiogenesis, *Blood*, **100**: 4495-4501.

- Larsson J, Goumans MJ, Sjöstrand L, Rooijen M, Ward D, Levéen P, Xu X, Dijke P, Mummery C & Karlsson S** (2001) Abnormal angiogenesis but intact hematopoietic potential in TGF- $\beta$  type I receptor-deficient mice, *The EMBO Journal*, **20**: 1663-1673.
- Lebrin F, Goumans MJ, Jonker L, Carvalho R, Valdimarsdottir G, Thorikay M, Mummery C, Arthur H & Dijke P** (2004) Endoglin promotes endothelial cell proliferation and TGF $\beta$ /ALK1 signal transduction, *The EMBO Journal*, **23**: 4018-4028.
- Maehara Y, Kakeji Y, Kabashima A, Emi Y, Watanabe A, Akazawa K, Baba H, Kohnoe S & Sugimachi K** (1999) Role of Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 in invasion and metastasis in gastric carcinoma, *Journal of Clinical Oncology*, **17**: 607-614.
- Massagué J** (2000) How cells read TGF- $\beta$  signals, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **1**: 169-178.
- Miyazono K, Hiroyuki S & Imamura T** (2003) Regulation of TGF $\beta$  signaling and its roles in progression of tumors, *Cancer Science*, **94**: 230-234.
- Neufeld G, Cohen T, Gengrinovitch S & Poltorak Z** (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors, *FASEB Journal*, **13**: 9-22.
- Oh SP, Seki T, Goss K, Imamura T, Yi Y, Donahoe P, Li L, Miyazono K, Dijke P, Kim S & Li E** (2000) Activin receptor-like kinase 1 modulates transforming growth factor- $\beta$ 1 signaling in the regulation of angiogenesis, *Proceedings of the National Academy of Science*, **97**: 2626-2631.
- Oshima M, Oshima H & Taketo M** (1996) TGF- $\beta$  receptor type II deficiency results in defects of yolk sac hematopoiesis and vasculogenesis, *Developmental Biology*, **179**: 297-302.
- Ota T, Fujii M, Sugizaki T, Ishii M, Miyazawa K, Aburatani H & Miyazono K** (2002) Targets of transcriptional regulation by two distinct type I receptors for Transforming Growth Factor- $\beta$  in Human Umbilical Vein Endothelial Cells, *Journal of Cellular Physiology*, **193**: 299-318.
- Pepper M** (1997) Transforming growth factor-beta: vasculogenesis, angiogenesis and vessel wall integrity, *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **8**: 21-43.
- Petit AM, Rak J, Hung MC, Rockwell P, Goldstein N, Fendly B & Kerbel RS** (1997) Epidermal growth factor and erbB2/neu receptor tyrosine Kinases downregulate vascular endothelial growth factor production by tumor cells in vitro and in vivo: angiogenic implication for signaling transduction therapy of solid tumors, *American Journal of Pathology*, **151**: 1523-1530.

**Sánchez-Elsner T, Botella L, Velasco B, Corbí A, Attisano L & Bernabéu C** (2001) Synergistic cooperation between hypoxia and Transforming Growth Factor- $\beta$  pathways on human Vascular Endothelial Growth Factor gene expression, *The Journal of Biological Chemistry*, **276**: 38527-38535.

**Schwarte-Waldhoff I & Schmiegel W** (2002) Smad4 transcriptional pathways in angiogenesis, *International Journal of Gastrointestinal Cancer*, **31**: 47-59.

**Soares R, Botelho M, Silva C, Amendoeira A, Wagner R, Ferro J & Schmitt F** (2000) Expression of TGF- $\alpha$  and EGFR in breast cancer and its relation to angiogenesis, *The Breast Journal*, **6**: 171-177.

**Soares R, Guo S & Schmitt F** (2003) Role of the estrogen antagonist ICI 182,780 in vessel assembly and apoptosis of endothelial cells, *Ultrastructural Pathology*, **27**: 33-39.

**Soares R, Guo S, Gärtner F, Schmitt F & Russo J** (2004a) 17 $\beta$ -estradiol-mediated vessel assembly and stabilization in tumor angiogenesis requires TGF $\beta$  and EGFR crosstalk, *Angiogenesis*, **6**: 271-281.

**Soares R, Balogh G, Guo S, Gärtner F, Russo J & Schmitt F** (2004b) Evidence for the Notch signaling pathway on the role of estrogen in angiogenesis, *Molecular Endocrinology*, **18**: 2333-2343.

**Suzigan S, Athanazio D, Milanezi F, Lima W, Verona C, Filho M, Muller M & Schmitt F** (2001) Microvessel density and bFGF expression in oncocytomas and renal cell carcinomas, *Journal of Urological Pathology*, **13**: 1-12.

**Tobin S, Douville K, Benbow U, Brinckerhoff C, Memoli V & Arrick B** (2002) Consequences of altered TGF-beta expression and responsiveness in breast cancer: evidence for autocrine and paracrine effects, *Oncogene*, **21**: 108-118.

**Vaisman N, Gospodarowicz D & Neufeld G** (1990) Characterization of the receptors for VEGF, *Journal of Biological Chemistry*, **265**: 19461-19466.

**Xu L & Massagué J** (2004) Nucleocytoplasmic shuttling of signal transducers, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **5**: 1-11.

**Yancopoulos G, Davis S, Gale N, Rudge J, Wiegand S & Holash J** (2001) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation, *Nature*, **407**: 242-248.